

ÉCOLE DOCTORALE 393 PIERRE LOUIS DE SANTÉ PUBLIQUE A PARIS
ÉPIDÉMIOLOGIE ET SCIENCES DE L'INFORMATION BIOMÉDICALE

DOCTORAT

Spécialité : Biostatistique

Cédric LAOUÉNAN

UTILISATION DES MODÈLES DYNAMIQUES POUR L'ÉVALUATION
DES TRAITEMENTS DE L'HÉPATITE C

Thèse dirigée par le Pr. France MENTRÉ

Soutenue le 03 juillet 2014

JURY

Monsieur Jean-Yves Mary
Monsieur Jacques Bénichou
Monsieur Benjamin Ribba
Madame France Mentré
Monsieur Jérémie Guedj
Monsieur Stanislas Pol
Monsieur Philippe Vanhems

Président du Jury
Rapporteur
Rapporteur
Directeur de thèse
Co-encadrant
Examineur
Examineur

Remerciements

A Jean-Yves Mary qui m'a fait l'honneur de présider ce jury de thèse.

A Jacques Bénichou et Benjamin Ribba pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, pour leur lecture attentive de celle-ci et leurs remarques stimulantes et constructives.

A Stanislas Pol et Philippe Vanhems pour avoir accepté d'être examinateurs dans mon jury et apporter ainsi leur regard expert sur les aspects cliniques et/ou méthodologiques.

A mon co-encadrant, Jérémie Guedj, je te remercie pour tes compétences, ta confiance, et ta patience, qui ont fait de ces années de thèse des années si agréables et constructives.

A ma directrice de thèse, France Mentré, qui m'a accueillie en 2009 en tant qu'AHU puis dans le cadre de cette thèse dans son service et son unité de recherche. Merci de m'avoir encouragée et fait confiance, d'exiger autant et toujours plus de nous, de savoir aiguïser nos sens critiques. Merci vraiment pour tout !

A tous les membres de l'équipe 4 de l'unité IAME, UMR 1137, INSERM & Paris Diderot.

A Adrien, Anne, Blaise, Camille, Charles, Corine, Cyrielle, Dieynaba, Dorothée, Emmanuelle, François, Hervé, Jean, Josselin, Julie, Julien, Quentin, Sarah, Simon, Solène, Steven, Thu, Thu Thuy, Tram. J'en oublie sûrement...

Vous avez tous participé à faire de ces quatre années une magnifique expérience humaine et cela toujours dans une bonne ambiance. Avec une mention spéciale pour Houda sans qui l'unité ne serait pas aussi agréable, et pour Marie pour le tennis et la relecture !

À mes parents, mes sœurs, mon frère, mes grands parents et belles familles pour votre soutien, votre amour et votre patience tout au long de ces études.

A mes ami(e)s de Bretagne, du Sud, de Paris et d'ailleurs, pour tous les bons moments passés ensembles.

A Olivier.

Table des matières

1. Introduction.....	8
1.1. L'infection par le VHC.....	8
1.1.1. Epidémiologie de l'infection par le virus de l'hépatite C.....	8
1.1.2. Histoire naturelle de l'infection par le virus de l'hépatite C	9
1.1.3. Diagnostic virologique de l'infection par le virus de l'hépatite C	10
1.2. Le traitement de l'infection par le virus de l'hépatite C	11
1.2.1. La bithérapie standard	12
1.2.2. La trithérapie	13
1.2.3. Les futurs traitements	14
1.3. Pharmacocinétique, efficacité et tolérance de l'interféron α pégylé, de la ribavirine, du telaprevir et du boceprevir	16
1.3.1. Ribavirine	16
1.3.2. Interféron α pégylé	17
1.3.3. Telaprevir et boceprevir	18
1.4. Particularités des patients cirrhotiques non répondeurs.....	19
1.5. Analyse de la réponse virologique au traitement du virus de l'hépatite C	21
1.5.1. Approche standard	21
1.5.2. Approche par modélisation.....	22
1.5.3. Modèles de dynamique virale sous traitement	22
1.6. Modélisation des relations dose-concentration-effet	24
1.7. Modèles non-linéaires à effets mixtes.....	26
1.7.1. Méthodes d'estimation	27
1.7.2. Prise en compte des charges virales sous la limite de detection	28
1.7.3. Tests statistiques.....	29
1.8. Objectifs de la thèse.....	31
2. Évaluation par simulation des tests de comparaison de traitements dans les modèles non-linéaires à effets mixtes	32
2.1. Résumé	32
2.2. Article 1 : <i>BMC Medical Research Methodology</i>	33
3. Analyse par modélisation des relations concentrations, cinétique virale et tolérance des trithérapies	44
3.1. L'essai clinique MODCUPIC	44
3.2. Modélisation du lien entre concentrations et cinétique virale des trithérapies....	45

3.2.1. Résumé	45
3.2.2. Article 2 : <i>Antimicrobial Agents and Chemotherapy</i>	46
3.3. Modélisation du lien entre concentrations et tolérance des trithérapies	74
3.3.1. Résumé	74
3.3.2. Article 3 : <i>Clinical Pharmacology & Therapeutics</i>	75
4. Conclusion et perspectives.....	95
5. Bibliographie.....	102

Productions scientifiques liées à la thèse

Articles publiés

Laouénan C, Guedj J, Mentré F. Clinical trial simulation to evaluate power to compare the antiviral effectiveness of two hepatitis C protease inhibitors using nonlinear mixed effect models: a viral kinetic approach. *BMC Medical Research Methodology*, 2013; 13:60.

Laouénan C, Marcellin P, Lapalus M, Khelifa-Mouri F, Boyer N, Zoulim F, Serfaty L, Bronowicki JP, Martinot-Peignoux M, Dorival C, Hézode C, Carrat F, Nicot F, Peytavin G, Mentré F, Guedj J. Using pharmacokinetic and viral kinetic modeling to estimate the antiviral effectiveness of telaprevir, boceprevir and Peg-IFN during triple therapy in treatment-experienced cirrhotic patients (ANRS CO20-CUPIC). *Antimicrobials Agents and Chemotherapy*, 2014 (*sous presse*).

Article en préparation

Laouénan C, Guedj J, Peytavin G, Nguyen THT, Lapalus M, Khelifa-Mouri F, Boyer N, Zoulim F, Serfaty L, Bronowicki JP, Martinot-Peignoux M, Dorival C, Hézode C, Carrat F, Nicot F, Marcellin P, Mentré F. Modelling effect of concentrations on anemia and thrombocytopenia in cirrhotic hepatitis C infected patients treated with Peg-IFN, ribavirin and a protease inhibitor (ANRS CO20-CUPIC). *Clinical Pharmacology & Therapeutics*.

Communications orales

Laouénan C, Marcellin P, Lapalus M, Khelifa-Mouri F, Boyer N, Zoulim F, Serfaty L, Bronowicki JP, Martinot-Peignoux M, Dorival C, Hézode C, Carrat F, Nicot F, Peytavin G, Mentré F, Guedj J. Modeling the relationship between drug concentration and early viral kinetics in cirrhotic treatment experienced patients in the ANRS MODCUPIC study. 14^{ème} Réunion du Réseau National Hépatites de l'ANRS, Paris, 23-24 Janvier 2014.

Laouénan C, Guedj J, Lapalus M, Khelifa-Mouri F, Martinot-Peignoux M, Boyer N, Serfaty L, Bronowicki JP, Zoulim F, Mentré F, Marcellin P and MODCUPIC ANRS-CO20 study group. Characterization of the early viral kinetics in compensated cirrhotic treatment-experienced patients with boceprevir and telaprevir. *International Liver Congress*, Amsterdam, Pays-Bas, 24-28 April 2013.

Laouénan C, Guedj J, Mentré F. Modeling hepatitis C viral kinetics to compare antiviral potencies of two protease inhibitors: a simulation study under real conditions of use. *33rd Annual Conference of the International Society for Clinical Biostatistics (ISCB)*, Bergen, Norvège, 19-23 Août 2012.

Laouénan C, Guedj J, Mentré F. Modélisation de la cinétique virale du VHC pour la comparaison de l'efficacité antivirale des inhibiteurs de protéase : une étude de simulation en condition réelle d'utilisation. *6^{ème} Conférence d'Epidémiologie Clinique (EPICLIN)*, Lyon, 9-11 Mai 2012.

Communications affichées

Laouénan C, Marcellin P, Lapalus M, Khelifa-Mouri F, Boyer N, Zoulim F, Serfaty L, Bronowicki JP, Martinot-Peignoux M, Dorival C, Hézode C, Carrat F, Nicot F, Peytavin G, Mentré F, Guedj J. Using pharmacokinetic and viral kinetic modeling to estimate the antiviral effectiveness of telaprevir, boceprevir and Peg-IFN during triple therapy in treatment-experienced HCV infected cirrhotic patients. *23rd Annual Meeting of the Population Approach Group Europe (PAGE)*, Alicante, Espagne, 10-13 Juin 2014.

Laouénan C, Guedj J, Lapalus M, Khelifa-Mouri F, Martinot-Peignoux M, Boyer N, Serfaty L, Bronowicki JP, Zoulim F, Mentré F, Marcellin P and MODCUPIC ANRS-CO20 study group. Modelling early viral hepatitis C kinetics in compensated cirrhotic treatment-experienced patients treated with triple therapy including telaprevir or boceprevir. *22nd Annual Meeting of the Population Approach Group Europe (PAGE)*, Glasgow, Ecosse, 11-14 Juin 2013.

Laouénan C, Guedj J, Mentré F. Modeling hepatitis C viral kinetics to compare antiviral potencies of two protease inhibitors: a simulation study under real conditions of use. *21st Annual Meeting of the Population Approach Group Europe (PAGE)*, Venise, Italie, 5-8 Juin 2012.

1. Introduction

1.1. L'infection par le VHC

L'hépatite C est une affection hépatique d'origine virale qui faisait partie des hépatites « non A, non B » à transmission parentérale jusqu'à ce que l'on mette en évidence l'agent étiologique en 1989. Le virus de l'hépatite C (VHC) est un virus à ARN de la famille des flavivirus, caractérisé par une forte hétérogénéité génétique. Six principaux génotypes (classés de 1 à 6) ont été identifiés ainsi que plusieurs sous-types (désignés par les lettres a, b, c...), qui jouent un rôle important dans la gravité de la maladie et sa réponse au traitement (Robertson et al. 1998).

1.1.1. Epidémiologie de l'infection par le virus de l'hépatite C

L'infection par le VHC est un problème majeur de santé publique. Dans le monde, le nombre de porteurs chroniques du VHC est estimé aux environs de 170 millions, soit 3% de la population mondiale, et l'incidence entre 3 et 4 millions infections par an (Lavanchy 2011; World Health Organization 2014). L'incidence réelle est incertaine car la distinction entre les formes aiguës et chroniques est difficile à faire. En France, la prévalence est évaluée à 0,84% (550 000 personnes environ) et l'incidence entre 2700 et 4400 infections par an principalement du fait de l'usage de drogues (InVS 2009). La mortalité annuelle imputable à l'hépatite C a été estimée en France à 2600 décès (InVS 2009). La France fait partie des pays de faible endémicité pour l'infection par le VHC. En effet, la sécurisation du sang et des produits sanguins a permis de tarir la principale source d'infections qu'était la transfusion sanguine avant la découverte du virus (Dubois et al. 1997).

La figure 1 représente la prévalence de l'infection par le VHC dans le monde. Il apparaît que l'infection par le VHC est un problème bien plus préoccupant dans les pays en développement que dans les pays occidentaux. Les génotypes 1, 2 et 3 sont présents sur tous les continents et rendent compte de la majorité des infections par le VHC en Europe et en Amérique du Nord. En France, le génotype le plus fréquent est le génotype 1.

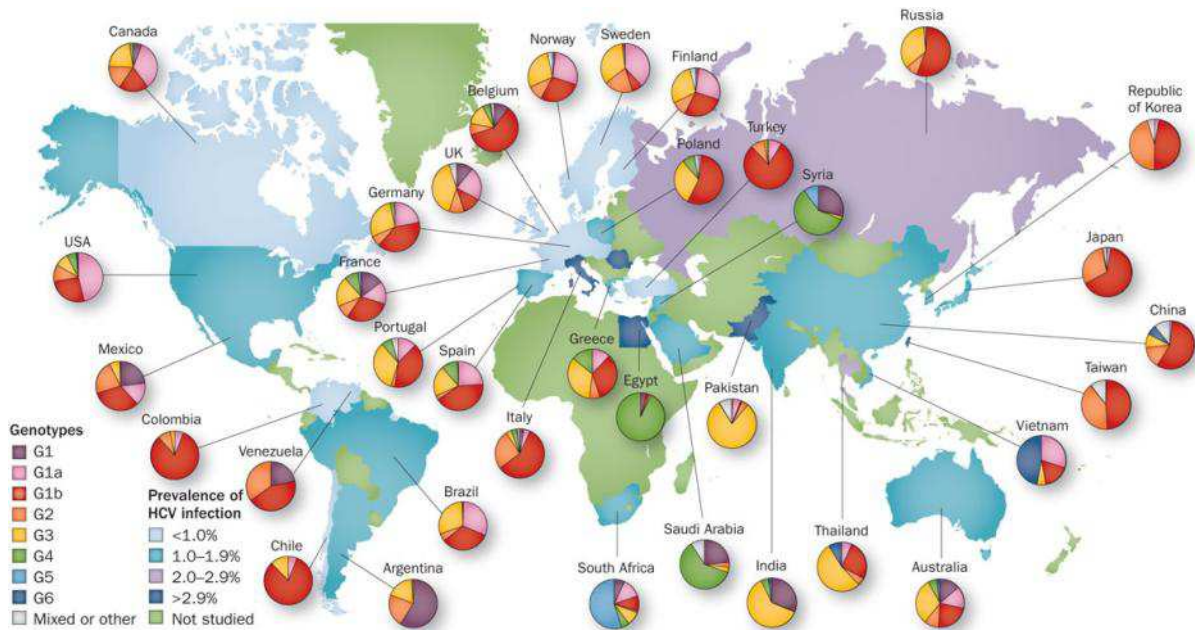


Figure 1 : Prévalence estimée de l'infection par le virus de l'hépatite C et distribution des génotypes dans le monde (Hajarizadeh et al. 2013).

1.1.2. Histoire naturelle de l'infection par le virus de l'hépatite C

La première phase de l'infection par le VHC est dite aiguë : elle peut provoquer un ictère, mais reste asymptomatique dans la majorité des cas (70 à 80%) d'où le risque de passer inaperçue. Il est estimé que 20 à 30% des personnes infectées vont éliminer spontanément le virus au cours des six premiers mois suivant le contact initial (Kamal et Nasser 2008). En cas de persistance du virus, l'hépatite évolue vers la chronicité. Le foie réagit à l'agression par le VHC par une réaction inflammatoire dont l'une des composantes est la fibrogenèse. La fibrose hépatique est la principale complication de l'hépatite C chronique. Son terme évolutif, la cirrhose, est responsable de la morbidité et de la mortalité de l'hépatite C. L'hépatite chronique C est susceptible d'évoluer dans environ 25% des cas vers la cirrhose dans un délai de 5 à 20 ans. En cas de cirrhose, l'incidence du carcinome hépatocellulaire est élevée (de l'ordre de 1 à 4% par an) (Lauer et Walker 2001) (Figure 2). Plusieurs facteurs sont associés à la vitesse de progression de la maladie, avec notamment une progression plus rapide chez les hommes, en cas de co-infection par le virus de l'hépatite B (VHB) ou le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), d'âge plus élevé ou de consommation d'alcool.

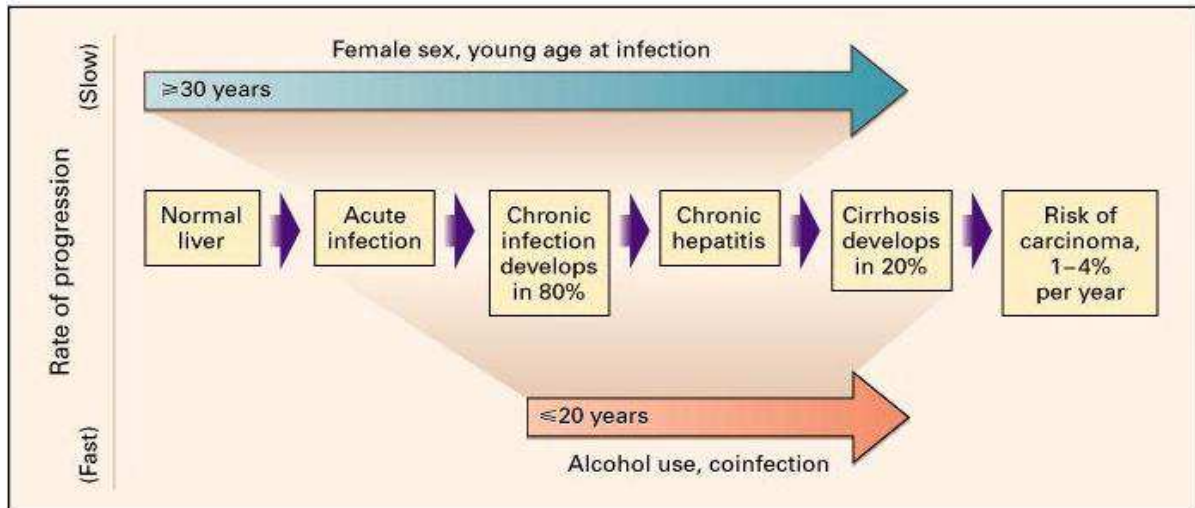


Figure 2 : Histoire naturelle de l'infection par le virus de l'hépatite C (Lauer et Walker 2001).

L'évaluation de la fibrose hépatique est essentielle chez les malades atteints d'hépatite chronique C afin d'établir la stratégie thérapeutique et de dépister la cirrhose. Le diagnostic de fibrose repose classiquement sur l'examen anatomo-pathologique d'un fragment de foie recueilli par une ponction biopsie hépatique (PBH). La fibrose est évaluée par le score Metavir (Bedossa et Poynard 1996) de F0 à F4 (la cirrhose correspondant au stade F4). Cependant, cet examen est invasif, ainsi d'autres méthodes diagnostiques non invasives de la fibrose sont disponibles comme l'élastométrie impulsionnelle ultrasonore hépatique (Fibroscan®) ou le Fibrotest® comprenant 5 marqueurs biologiques (alpha-2-macroglobuline, gamma-glutamyl transpeptidase, bilirubine totale, apolipoprotéine A1, et haptoglobine) avec un ajustement selon le sexe et l'âge.

1.1.3. Diagnostic virologique de l'infection par le virus de l'hépatite C

Sur le plan sérologique, la survenue d'une infection après exposition au virus est caractérisée par l'acquisition d'anticorps anti-VHC dans le sérum, détectés par dosage immunoenzymatique (technique d'ELISA). Le passage à la chronicité après l'infection par le VHC est caractérisé par la persistance d'acide ribonucléique (ARN) viral dans le sang. L'ARN du VHC peut être quantifié (détermination de la charge virale exprimée en unités internationales (UI)/ml) par des techniques d'amplification de type Polymerase Chain Reaction (PCR) en temps réel qui permettent une détection et une quantification simultanée.

Les données de charge virale sont sujettes à une limite de détection liée aux dispositifs expérimentaux. En effet les appareils de mesure sont calibrés pour rendre des

résultats de mesure de concentration fiables, c'est-à-dire ayant une variabilité inférieure à 20%. Il existe un seuil en dessous duquel deux mesures d'une même concentration varient généralement de plus de 20 %, la concentration étant trop faible pour être mesurée avec précision. Dans ce cas, on sait seulement que la concentration du marqueur est en dessous du seuil (appelée aussi en anglais limite of detection, LOD), mais on ne connaît pas sa valeur. Ces techniques de PCR possèdent une LOD de 10 à 15 UI/ml.

La détermination de la charge virale du VHC n'a pas d'intérêt dans le diagnostic de l'infection par le VHC. En revanche, elle prend toute son importance dans le bilan pré-thérapeutique et dans le suivi thérapeutique des patients atteints d'hépatite C chronique.

1.2. Le traitement de l'infection par le virus de l'hépatite C

Contrairement aux virus des hépatites A et B, il n'existe aucun vaccin pour prévenir l'infection. Le VHC se réplique dans le cytoplasme cellulaire, son génome ne s'intègre pas à celui de la cellule hôte et il ne présente pas de forme de latence. Dans ces conditions, l'éradication définitive de l'infection virale peut être envisagée. Cette éradication est l'objectif principal du traitement de l'hépatite C chronique, dont le succès permet d'éviter l'évolution ultérieure vers les complications de la maladie.

Plusieurs types de réponses virologiques peuvent être observés au cours du traitement (Figure 3). La guérison virologique ou réponse virologique soutenue (RVS) ou sustained virologic response (SVR) en anglais est définie par une charge virale indétectable dans le sérum 24 semaines après l'arrêt du traitement.

Parmi les non réponses il est possible de distinguer :

- une réponse nulle ou partielle (partial or null response en anglais, définie par l'absence de diminution de la charge virale ou par une diminution de $2 \log_{10}$ UI/ml, respectivement),
- un échappement (breakthrough en anglais, définie par une charge virale indétectable sous traitement qui devient de nouveau détectable sous traitement),
- une rechute (relapse en anglais, définie par une charge virale indétectable sous traitement qui devient de nouveau détectable après l'arrêt du traitement).

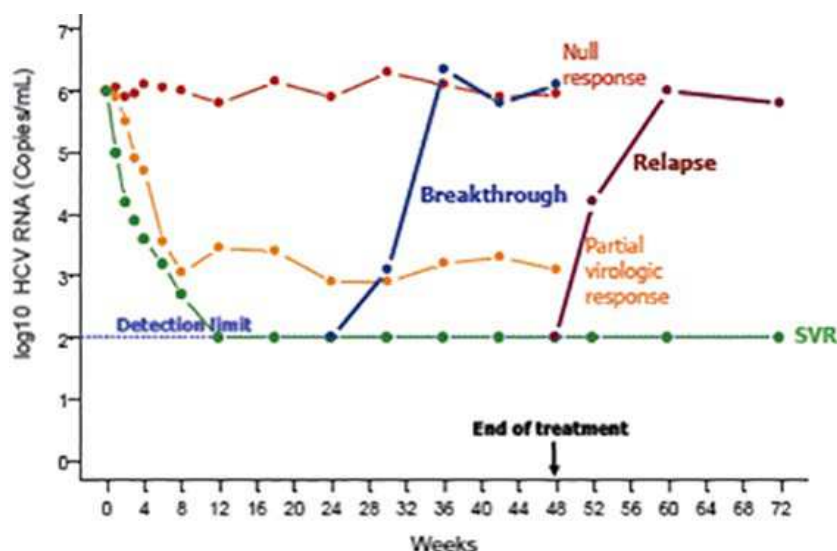


Figure 3 : Types de réponses virologiques sous traitement avec de l'interféron α pégylé et de la ribavirine (Snoeck et al. 2010).

1.2.1. La bithérapie standard

Depuis 1998, le traitement de référence de l'hépatite chronique C était une bithérapie associant une injection hebdomadaire d'interféron α pégylé (Peg-IFN- α) et la prise quotidienne de ribavirine *per os* (un analogue nucléosidique de la guanosine). Cette bithérapie était administrée 24 semaines chez les patients infectés par le génotype 2 ou 3 et non cirrhotiques et 48 semaines chez les patients infectés par le génotype 1.

Les deux Peg-IFN- α ayant actuellement une autorisation de mise sur le marché (AMM) sont le Peg-IFN- α 2a [Pegasys®] et le Peg-IFN- α 2b [Viraferon®]. Pour la ribavirine, les deux spécialités disponibles sont Copegus® et Rebetol®.

Les facteurs prédictifs de RVS sont notamment les suivants : le génotype du VHC, le niveau de la charge virale initiale, la posologie et la durée de traitement, le polymorphisme génétique de l'IL28B, le stade de fibrose hépatique, l'âge, le sexe, l'origine ethnique, l'indice de masse corporelle, l'insulino-résistance et les co-infections (Manns et al. 2006).

Toutefois, cette bithérapie ne permettait de guérir seulement 50% des patients, tous génotypes confondus (Marcellin 2009). Le génotype du VHC est le principal facteur prédictif de réponse au traitement chez les patients traités par bithérapie. En effet, le taux de RVS était de 75 à 85% chez les patients infectés par le génotype 2 ou 3, mais il était inférieur à 50% chez les patients infectés par le génotype 1 ou 4 (Manns et al. 2001; Fried et al. 2002; Khuroo et al. 2004; Zeuzem et al. 2004).

1.2.2. La trithérapie

Dans le but d'améliorer le taux de réponse aux traitements, de nouvelles approches thérapeutiques se sont développées et notamment les inhibiteurs spécifiques des enzymes du VHC nécessaires à la réplication virale. Ces molécules sont dites à activité antivirale directe (AAD). Un véritable tournant dans la prise en charge de l'hépatite C est intervenu en 2011 avec l'AMM de deux molécules inhibitrices de la protéase NS3/4A, le boceprevir [Victrelis®] et le telaprevir [Incivo®] (Food and Drug Administration 2013a, 2013d). C'est deux molécules, appelées également inhibiteurs de protéase de 1^{ère} génération, sont prescrites en association avec le Peg-IFN- α et la ribavirine chez les patients infectés par le génotype 1.

Le telaprevir (750 mg toutes les 8 heures, *per os*) est combiné avec du Peg-IFN- α 2a (1,5 μ g/kilo/semaine, sous cutanée) et de la ribavirine (en fonction du poids de 1000 à 1200 mg/jour répartis en 2 prises par jour, *per os*). Le boceprevir (800 mg toutes les 8 heures, *per os*) est, contrairement au telaprevir, combiné avec du Peg-IFN- α 2b (180 μ g/semaine, sous cutanée) et de la ribavirine (en fonction du poids de 1000 à 1200 mg/jour répartis en 2 prises par jour, *per os*). Les schémas thérapeutiques sont différents entre ces deux trithérapies. Pour le schéma avec le boceprevir, l'utilisation lors d'une phase initiale dite de lead-in pendant 4 semaines de Peg-IFN- α /ribavirine précède l'introduction du boceprevir, puis la trithérapie est poursuivie pendant 44 semaines. Pour le telaprevir, aucune phase de lead-in n'est indiquée, la molécule est prescrite en trithérapie pendant 12 semaines, suivie d'une phase de Peg-IFN- α /ribavirine pendant 36 semaines. La conduite du traitement par ces trithérapies doit tenir compte des facteurs prédictifs de la réponse (stade de fibrose, réponse à une bithérapie antérieure). L'évolution de la charge virale au cours du traitement est également essentiel car elle permet d'adapter la durée du traitement en fonction du profil de la réponse virologique, voire d'interrompre la trithérapie en cas de réponse insuffisante. On parle dans ce cas là de traitement guidé par la réponse (ou response-guided therapy en anglais).

Cependant ces trithérapies sont responsables de nombreux effets secondaires (détaillés ci après) et des résistances virologiques surviennent dans 15% des cas de non réponse (Jacobson et al. 2011). Ces résistances sont dues à l'émergence de mutations de résistances (mutants) lors du traitement et ces mutants peuvent persister pendant un temps pouvant aller jusqu'à 3 ans (Halfon et Locarnini 2011). En effet ces inhibiteurs de protéase de 1^{ère} génération ont une barrière génétique à la résistance faible (une seule mutation étant suffisante pour qu'il y ait une résistance).

Ces trithérapies sont devenues le nouveau standard permettant d'obtenir un taux de RVS de 70 à 75% chez les patients infectés par le génotype 1 et naïfs de traitement (Jacobson et al. 2011; Poordad et al. 2011). Ces deux molécules permettent d'obtenir des taux de RVS très proches, même s'il n'y pas eu d'essai comparatif prospectif face à face.

1.2.3. Les futurs traitements

De nombreuses autres molécules plus puissantes et mieux tolérées ayant les mêmes cibles thérapeutiques, ou d'autres, sont disponibles depuis peu ou sont en cours de développement (plus d'une soixantaine de molécules sont actuellement en développement pré-clinique et clinique, Figure 4). Ces nouvelles molécules AAD sont principalement dirigées contre la protéase NS3/4A, la polymérase NS5B et le complexe NS5A du VHC avec des taux de RVS atteignant 90 à 100%, laissant entrevoir une éradication de l'infection à VHC dans les prochaines années. Ces molécules ne sont jamais utilisées en monothérapie mais en combinaison thérapeutique (avec ou sans Peg-IFN- α , avec ou sans ribavirine), avec une durée de traitement raccourcie (Halfon et Cacoub 2014).

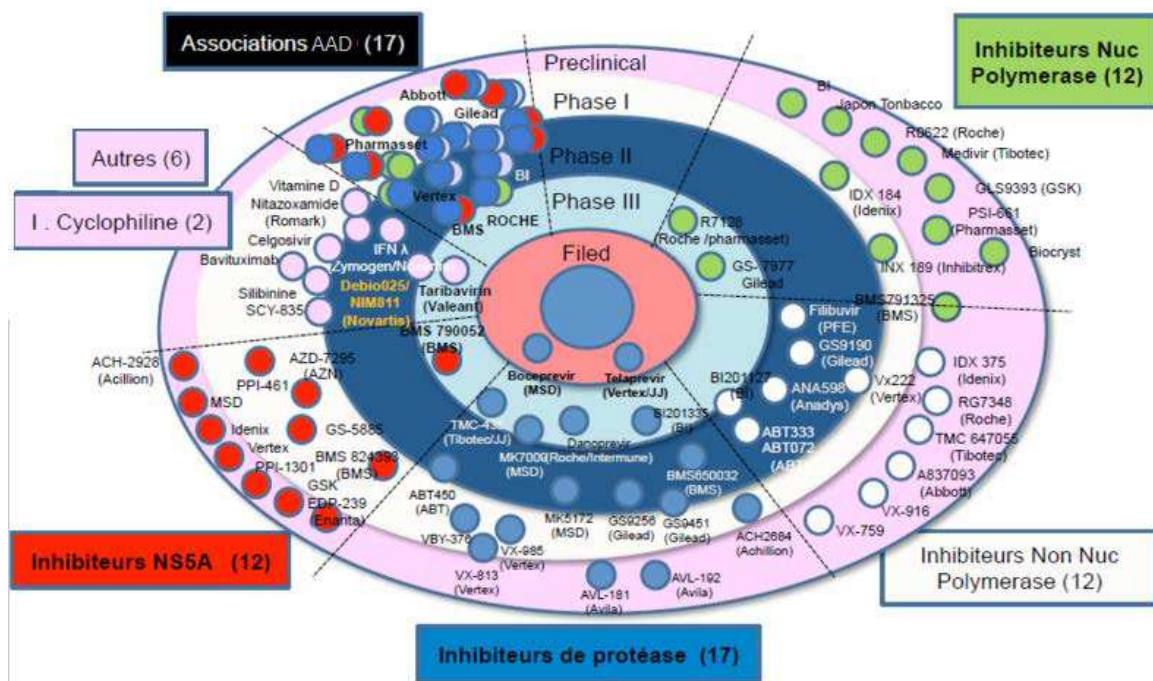


Figure 4 : Molécules en cours de développement contre le virus de l'hépatite C (Bourlière 2013).

Parmi ces nouvelles molécules, nous pouvons citer par exemple :

- les inhibiteurs de protéase de 2^{ème} génération qui ont une barrière génétique à la résistance plus élevée, une fréquence d'administration moins élevée (une fois par jour), une plus faible fréquence d'effets indésirables, un spectre d'activité antivirale pan-génotypique (excepté le génotype 3) et un taux de RVS de 80 à 90%. Les inhibiteurs de protéase de 2^{ème} génération pourront être utilisés avec ou sans Peg-IFN- α /ribavirine, mais aussi en combinaison thérapeutique avec d'autres AAD, en trithérapie ou quadruple thérapie. Le simeprevir [Olysio®], qui est un inhibiteur de la protéase NS3/4A, a eu son AMM en décembre 2013 pour les patients infectés par le génotype 1 en combinaison avec le Peg-IFN- α et la ribavirine (Food and Drug Administration 2013b).
- les inhibiteurs du complexe NS5A qui rendent le complexe de réplication virale non fonctionnel. Les principales caractéristiques des inhibiteurs de la NS5A sont leur importante puissance virologique et leur barrière génétique à la résistance faible. Ces molécules sont actuellement en phase II et III de développement, et sont utilisées principalement sans interféron et en combinaison avec d'autres AAD (Pol et al. 2012).
- les inhibiteurs de la polymérase NS5B, parmi lesquels deux sous-classes sont distinguées, les inhibiteurs nucléosidiques ou nucléotidiques et les inhibiteurs non nucléosidiques. Les inhibiteurs nucléosidiques ont de nombreuses propriétés intéressantes notamment la particularité d'être pan-génotypique, de ne pas ou peu engendrer de phénomènes de résistances virologiques, d'être administrés une fois par jour, de ne pas engendrer d'effets secondaires majeurs et d'entraîner peu d'interactions médicamenteuses. Le sofosbuvir [Sovaldi®] qui est un inhibiteur nucléotidique de la polymérase NS5B a eu son AMM en décembre 2013 pour les patients infectés par les génotypes 1 ou 4 en combinaison avec le Peg-IFN- α et la ribavirine et pour les patients infectés par les génotypes 2 ou 3 en combinaison avec la ribavirine uniquement (Food and Drug Administration 2013c; EMA 2014). Ces nouvelles thérapies permettent d'obtenir un taux de RVS de plus de 90% avec 12 à 24 semaines de traitement (Jacobson et al. 2013; Lawitz et al. 2013). Les inhibiteurs non nucléosidiques ont une puissance antivirale modérée, une barrière génétique à la résistance faible, une activité limitée au génotype 1 et seront utilisés en combinaison thérapeutique avec d'autres AAD.

La révolution thérapeutique du VHC est en marche, à un rythme accéléré. Mais il restera à préciser quel est le rapport coût-efficacité de ces nouvelles combinaisons thérapeutiques et de résoudre les potentiels problèmes d'accès aux traitements surtout dans pays à ressources limitées. En effet le coût des ces nouveaux traitements est plus de

deux fois supérieur au coût des trithérapies contenant un inhibiteur de protéase de 1^{ère} génération (Deuffic-Burban et al. 2014).

1.3. Pharmacocinétique, efficacité et tolérance de l'interféron α pégylé, de la ribavirine, du telaprevir et du boceprevir

1.3.1. Ribavirine

- Pharmacocinétique (Tableau 1)

L'état d'équilibre de la ribavirine est atteint en quatre semaines, la demi-vie est de 300 heures. Sa biodisponibilité est de 45 à 65%, avec une importante variabilité pharmacocinétique intra et inter-individuelle atteignant 30% après l'absorption d'une dose unique (Preston et al. 1999). La ribavirine est transportée au niveau de toutes les cellules de l'organisme où elle est phosphorylée. La ribavirine triphosphate est le métabolite intracellulaire principal. Le transport vers le milieu extracellulaire nécessite une déphosphorylation. Cette propriété est déficiente au niveau érythrocytaire, ce qui explique le défaut de déphosphorylation de la molécule et donc son accumulation (Duclos-Vallée et Samuel 2000). L'élimination de la ribavirine est fortement liée à la fonction rénale (Bruchfeld et al. 2002).

- Efficacité

Malgré son ancienneté, le mode d'action de la ribavirine reste imparfaitement élucidé et largement débattu et de nombreuses études montrent une faible efficacité antivirale de la ribavirine (Pawlotsky et al. 2004; Mihm et al. 2014; Rotman et al. 2014). Cependant, la ribavirine potentialise l'effet antiviral du Peg-IFN- α et un taux de RVS plus élevé a été retrouvé dans les groupes de patients ayant une exposition plasmatique à la ribavirine plus importante (Arase et al. 2005; Loustaud-Ratti et al. 2008).

- Tolérance

La ribavirine engendre des effets secondaires responsables d'un arrêt de traitement chez 3 à 11% des patients allant jusqu'à 35% chez les patients cirrhotiques (Zoulim et al. 1998). Ces effets sont en général réversibles à l'arrêt du traitement. La ribavirine est responsable de manifestations allergiques comme une toux sèche chronique et un prurit. Le plus fréquent des effets secondaires est l'anémie hémolytique concentration

dépendante secondaire à l'accumulation de ribavirine au niveau intra érythrocytaire. Chez les patients traités par bithérapie, environ 30% ont une anémie (taux d'hémoglobine < 10 g/dl) au cours du traitement et 13% nécessitent une réduction de dose de ribavirine (Sulkowski et al. 2004; Tanaka et al. 2005). Ces proportions sont d'autant plus importantes que le patient est cirrhotique. Récemment, un suivi thérapeutique pharmacologique de la ribavirine a été suggéré chez les patients atteints d'hépatite chronique C pour optimiser le traitement et un essai thérapeutique randomisé a montré qu'une stratégie de réduction de dose de la ribavirine était efficace pour la prise en charge de l'anémie (Solas et al. 2011; Poordad et al. 2013). L'intérêt d'un suivi thérapeutique pharmacologique de la ribavirine est particulièrement renforcé car les concentrations plasmatiques toxiques de ribavirine sont très proches des concentrations nécessaires à l'obtention d'une efficacité thérapeutique définissant ainsi un index thérapeutique très étroit (Solas et al. 2011). Quelques études ont également rapporté une corrélation significative entre la concentration de ribavirine intra-érythrocytaire et la réduction du taux d'hémoglobine (Homma et al. 1999; Inoue et al. 2006).

1.3.2. Interféron α pégylé

- Pharmacocinétique (Tableau 1)

La pégylation de l'interféron diminue la clairance rénale du médicament, prolonge sa demi-vie et augmente sa concentration plasmatique (Pedder 2003). De ce fait une injection par semaine suffit pour obtenir des concentrations d'interféron stables. Les deux types de Peg-IFN- α sont différents de part leur structure et leur poids moléculaire (40 kD pour le Peg-IFN- α 2a et 12 kD pour le Peg-IFN- α 2b). Le Peg-IFN- α 2a est éliminé principalement par le foie et le Peg-IFN- α 2b principalement par le rein. Ainsi, les caractéristiques pharmacocinétiques et pharmacodynamiques des deux produits diffèrent avec une demi-vie allongée et un volume de distribution plus faible pour le Peg-IFN- α 2a par rapport au Peg-IFN- α 2b. L'état d'équilibre avec une administration hebdomadaire de Peg-IFN- α 2a est atteint au bout de 5 à 8 semaines (Perry et Jarvis 2001; Keating et Curran 2003).

- Efficacité

Les interférons sont des protéines cellulaires naturelles appartenant à la famille des cytokines. Le Peg-IFN- α agit par différents mécanismes : une activité antivirale, une activité immunomodulatrice (via notamment la stimulation de l'expression des molécules du

complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et l'activation des cellules effectrices) et une activité antiproliférative (Pawlotsky 2000).

Les traitements utilisant l'association de la ribavirine avec le Peg-IFN- α 2a ou le Peg-IFN- α 2b révèlent des taux similaires de RVS chez les patients infectés par le génotype 1 (40% pour le Peg-IFN- α 2a et 41% pour le Peg-IFN- α 2a) (Toyoda et Kumada 2009; Foster 2010).

- Tolérance

Les profils de tolérance du Peg-IFN- α 2a et du Peg-IFN- α 2b sont similaires. L'interféron est responsable d'effets secondaires bien connus, associant des troubles hématologiques (neutropénie ou thrombopénie) par sidération médullaire (30% des cas) (Hayashi et al. 2014), un syndrome pseudo grippal (50% des cas), une asthénie (70% des cas), des troubles neuropsychiques (irritabilité, dépression dans 16 à 30% des cas), des troubles digestifs et des troubles cutanés (Pawlotsky et Dhumeaux 2004). Ces effets secondaires sont réversibles à l'arrêt du traitement.

1.3.3. Telaprevir et boceprevir

- Pharmacocinétique (Tableau 1)

Le telaprevir doit être administré en 3 prises quotidiennes avec de la nourriture (de préférence contenant des graisses) ce qui augmente l'exposition à la molécule. Le telaprevir est principalement éliminé dans les selles. La demi-vie plasmatique est faible entre 4 et 4,7 heures.

L'état d'équilibre du boceprevir est atteint en 1 jour. Le boceprevir doit être administré en 3 prises quotidiennes avec de la nourriture ce qui augmente l'exposition de 60%. Le boceprevir est principalement éliminé par le foie. La demi-vie plasmatique est faible à 3,4 heures. Très peu de données sont disponibles sur la pharmacocinétique du boceprevir.

- Efficacité

Le telaprevir et le boceprevir sont des inhibiteurs de la protéase NS3/4A. Dans un essai de phase I, une association a été montrée entre l'exposition au telaprevir et un déclin viral accéléré par rapport à la bithérapie standard (Reesink et al. 2006). Dans les essais de phase III l'exposition au telaprevir était associée avec la RVS (Vertex Pharmaceuticals 2010).

Très peu de données sont disponibles sur le lien entre l'exposition au boceprevir et la réponse. Dans un essai de phase III de petite taille (116 patients) une faible association a été montrée entre l'exposition au boceprevir et la RVS (Merck 2011).

- Tolérance

Dans les essais de phase III qui ont évalué la tolérance et l'efficacité des trithérapies avec un inhibiteur de protéase de 1^{ère} génération, de nombreux effets secondaires ont été rapportés (Burney et Dusheiko 2010; Bacon et al. 2011; Jacobson et al. 2011; Poordad et al. 2011; Zeuzem et al. 2011).

Le telaprevir est notamment associé à une augmentation de rashes cutanés (37% des cas), d'anémies (36% des cas) et d'événements gastro-intestinaux. L'exposition au telaprevir est donc significativement associée à une augmentation du risque d'anémie (Vertex Pharmaceuticals 2010), cependant, l'effet de la ribavirine sur la toxicité hématologique semble prépondérante. Un arrêt de traitement à cause d'un effet secondaire intervient dans 13 à 20% des cas de patients traités par telaprevir.

Les événements indésirables les plus fréquemment rapportés avec le boceprevir sont l'anémie (50% des cas), la fatigue, la nausée et les céphalées. Un arrêt de traitement à cause d'un effet secondaire intervient dans 9 à 19% des cas de patients traités par boceprevir.

Parameter	t_{\max} (h)	C_{\max} (ng/mL)	C_{\min} (ng/mL)	AUC_{τ} (ng·h/mL)	V_d/F (L)	CL/F (L/h)	$t_{1/2}$ (h)
Drug							
Peginterferon- α_{2a}	72–96	9–10	16	1,295–1,663	6–14	0.094	160
Peginterferon- α_{2b}	15–44	NA	0.32	NA	0.99	0.022	40
Ribavirin	2	2,748	2,112	25,361	NA	26	120–170
	1.5–3	3,680	2,200	228,000	2,825–5,000	38.2	298
Boceprevir	2	1,723–1,913	88–90	5,408–6,147	772	161	3.4
Telaprevir	4–5	3,510	2,030	22,300	252	32.4	9–11

Tableau 1 : Paramètres pharmacocinétiques du Peg-IFN- α_{2a} , du Peg-IFN- α_{2b} , de la ribavirine, du boceprevir et du telaprevir (de Kanter et al. 2014).

1.4. Particularités des patients cirrhotiques non répondeurs

Dans les travaux de cette thèse, nous nous intéressons particulièrement aux patients « difficiles à traiter », c'est-à-dire aux patients infectés par le génotype 1 du VHC, cirrhotiques et n'ayant pas éradiqué le virus lors d'un précédent traitement. En effet, le

génotype 1 est le plus difficile à traiter et plus la fibrose hépatique est importante plus le taux de RVS est faible.

Chez les patients atteints de cirrhose, le but du traitement n'est pas seulement d'atteindre une RVS, mais aussi de stabiliser l'infection et ainsi de limiter les complications évolutives de la cirrhose, notamment le carcinome hépatocellulaire (Marinho et al. 2014).

Avec la bithérapie standard, le taux de RVS chez les patients infectés par le génotype 1 étaient de 70% chez les patients avec une atteinte hépatite minime (score METAVIR F0) contre seulement 31% chez les patients avec une fibrose avancée (F3-F4) (Bourlière et al. 2012). Chez les patients non répondeurs à une première bithérapie standard (Peg-IFN- α /ribavirine), répéter ce même schéma thérapeutique est efficace pour seulement 9 à 15% des patients, tous génotypes confondus et seulement 4 à 6% pour le génotype 1 (Jensen et al. 2009; Poynard et al. 2009). Le besoin de nouveaux traitements était donc particulièrement important pour ces patients.

Chez les patients infectés par le génotype 1 qui étaient non répondeurs à la bithérapie standard, les trithérapies contenant un inhibiteur de protéase de 1^{ère} génération permettent une augmentation significative de la RVS de 50% chez les patients répondeurs–rechuteurs et de 38% chez les patients répondeurs nuls pour le boceprevir ; de 60% chez les patients répondeurs–rechuteurs et de 25% chez les patients répondeurs nuls pour le telaprevir (Bacon et al. 2011; Zeuzem et al. 2011).

Cependant, peu de patients cirrhotiques étaient inclus dans les essais cliniques de phase III des trithérapies. L'ANRS a donc mis en place en 2011 un observatoire national de l'échec thérapeutique et des résistances chez les patients VHC infectés par le génotype 1, cirrhotiques, non répondeurs à une bithérapie antérieure et traités par une nouvelle trithérapie en condition réelle d'utilisation. Il s'agit de la cohorte CO20 CUPIC (investigateur principal : Dr C Hézode - hôpital Henri Mondor, Créteil ; Centre de méthodologie et de gestion : Pr F Carrat - INSERM, UMR 1136, Université Pierre et Marie Curie, Paris). Au total, 511 patients ont été inclus (299 traités par une trithérapie avec le telaprevir et 212 par une trithérapie avec le boceprevir). Les résultats de cette cohorte ont montré une efficacité suboptimale des trithérapies dans cette population de patients. En effet, le taux de RVS était seulement de 52% et de 43% chez les patients traités par telaprevir et boceprevir, respectivement (Hézode et al. 2013).

De plus, dans cette cohorte, Hézode et al. ont rapporté un taux élevé d'effets secondaires (50%). Plus précisément, 34% des patients avaient une anémie (taux

d'hémoglobine < 10 g/dl) et 17% une thrombopénie (nombre de plaquettes < 50 000 /mm³) (Hézode et al. 2014).

C'est donc dans ce cadre que nous avons souhaité étudier précisément l'origine de cette réponse suboptimale au traitement en menant une étude ancillaire de CUPIC (étude ANRS MODCUPIC, détaillée dans la partie 3.1). Pour cela nous avons modélisé, dans un échantillon de patients de la cohorte CUPIC, les relations entre les concentrations des médicaments, la cinétique de la charge virale et la tolérance (les résultats sont présentés dans les parties 3.2 et 3.3).

1.5. Analyse de la réponse virologique au traitement du virus de l'hépatite C

1.5.1. Approche standard

Plusieurs types de critères sont habituellement utilisés dans les essais cliniques pour évaluer et comparer différentes stratégies thérapeutiques de l'hépatite C :

- critère binaire : analyse, à l'issue d'une période de traitement définie à l'avance, de la proportion de patients en échec virologique. Dans le cadre du VHC ce critère est la RVS (*i.e.* charge virale indétectable dans le sérum 24 semaines après l'arrêt du traitement).
- critère continu : analyse de la décroissance d'un marqueur. Pour le VHC il est courant d'analyser le déclin de la charge virale à une date donnée par rapport à son niveau lors de l'initiation du traitement (delta de charge virale).

Ces approches reposent sur des méthodes statistiques simples (test de comparaison de proportions ou de moyennes) et la détection de covariables/facteurs de risque se fait aussi à l'aide de modèles de régression classiques.

Avec l'analyse du delta de charge virale, les principales faiblesses méthodologiques sont que l'on ignore l'information apportée par le caractère répété des données et la prise en compte de la censure de la charge virale sous la LOD (Ghani et al. 2001). Différentes stratégies de prise en compte des données sous la LOD sont possibles, nous les détaillons dans la partie 1.6 ci après.

Afin de surmonter ces limites et analyser l'ensemble des charges virales disponibles, de nombreux auteurs ont proposé des modélisations plus complexes de la dynamique de la charge virale.

1.5.2. Approche par modélisation

En décrivant mathématiquement la réduction de charge virale plasmatique après initiation du traitement standard à base d'IFN puis de Peg-IFN- α , des éléments cruciaux de la cinétique *in vivo* du VHC ont pu être estimés comme le taux de clairance et la production journalière du virus (Dahari et al. 2009). Cette modélisation mathématique a permis, en outre, d'établir le mécanisme d'action des antiviraux et d'estimer leur efficacité antivirale *in vivo*, fournissant ainsi un outil essentiel pour la comparaison clinique précoce de stratégies thérapeutiques, leur optimisation et donc l'individualisation des stratégies thérapeutiques (Neumann et al. 1998, 2000; Perelson 2002; Snoeck et al. 2010). De plus, l'utilisation de modèles biomathématiques de la cinétique virale permet de mieux quantifier les déterminants de la réponse au traitement (Mihm et al. 2006).

En raison de la complexité des modèles considérés, une approche biostatistique sophistiquée est nécessaire. En particulier, l'utilisation de modèles non-linéaires à effets mixtes (MNLEM) est l'outil de référence pour analyser précisément les paramètres de cinétique virale, la relation dose-concentration-effet du médicament, ainsi que leur variabilité individuelle. Ces MNLEM sont particulièrement bien adaptés à l'analyse de mesures répétées dans le temps et donc à l'analyse de la réponse virale sous traitement à partir de données obtenues dans un groupe de patients, et permettent l'estimation précise des paramètres pharmacocinétiques moyens et individuels, leurs variabilités inter-patient et l'effet de covariables.

1.5.3. Modèles de dynamique virale sous traitement

Héritiers des modèles compartimentaux en épidémiologie, ces modèles de dynamique virale mettent en équations les principaux mécanismes de l'interaction entre le virus et l'hôte. Introduits dans le contexte de la décroissance de la charge virale plasmatique du VIH après initiation d'un inhibiteur de protéase (Ho et al. 1995; Wei et al. 1995; Perelson et al. 1996), cette approche a ensuite été appliquée à de nombreux autres virus, comme le VHC (Neumann et al. 1998). Une conséquence remarquable est que les paramètres de ces modèles ont une signification biologique.

Pour expliquer le déclin biphasique de la charge virale observé chez les patients infectés par le VHC traités, le modèle de dynamique virale standard a été décrit par Neumann *et al.* (1998) (Figure 5). Il est défini par le système d'équations différentielles ordinaires (EDO) suivant :

$$\begin{cases} \frac{dT}{dt} = s - dT - bVT \\ \frac{dI}{dt} = bVT - \delta I \\ \frac{dV}{dt} = p(1 - \varepsilon)I - cV \end{cases}$$

où :

- T est le nombre de cellules hépatiques cibles,
- I est nombre de cellules hépatiques infectées,
- V est la concentration de virus [UI/mL],
- b est le taux d'infection des cellules cibles [UI/mL/jour],
- s est le taux de production de cellules cibles [UI/mL/jour] et d le taux d'élimination de cellules cibles [jour⁻¹],
- p est le taux de production de virus par cellule infectée en l'absence de traitement [UI/mL/cellule/jour],
- le traitement réduit le taux de production de virus par cellule de p à $p(1 - \varepsilon)$, où ε est l'efficacité antivirale constante du traitement à bloquer la production virale (si $\varepsilon = 0.9$, cela signifie que 90% de la production virale est bloquée).

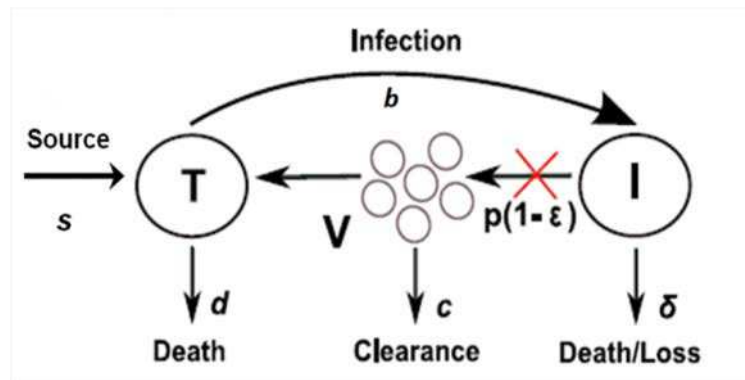


Figure 5 : Modèle standard de dynamique virale (Neumann et al. 1998).

Le modèle suggère que la phase initiale de la décroissance de la charge virale est due à la clairance rapide des virus avec un taux c [jour⁻¹] et que la seconde phase de décroissance est le reflet de δ , où δ est le taux d'élimination de cellules infectées [jour⁻¹]. Et donc pour une thérapie où ε est proche de 1, la seconde phase serait approximativement égal à δ .

1.6. Modélisation des relations dose-concentration-effet

La modélisation mathématique et statistique est de plus en plus utilisée en pharmacologie pour étudier les relations dose-concentration-effet des médicaments (Figure 6). Les modèles pharmacocinétiques (PK) décrivent la relation entre la dose de produit administrée et sa concentration dans l'organisme, et les modèles pharmacodynamiques (PD) décrivent la relation entre la concentration et son effet sur l'organisme. Ces modèles permettent de décomposer les différentes sources de variabilité de la relation dose-concentration-effet.

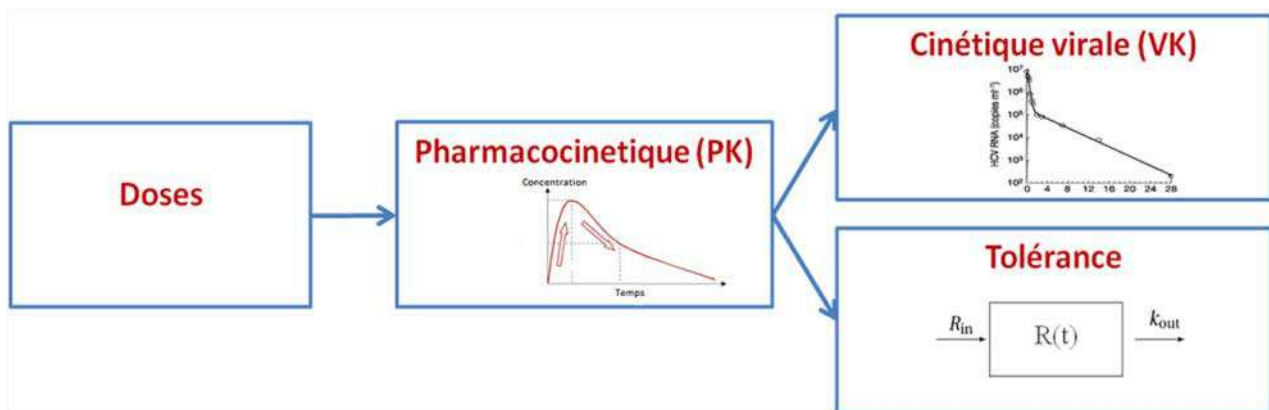


Figure 6 : Modèle pharmacocinétique - cinétique virale - tolérance.

Les mesures de concentrations du médicament au cours du temps permettent de caractériser sa PK. La modélisation PK permet de prendre en compte les connaissances acquises au cours des différentes étapes du développement sur la PK du médicament étudié. Ces informations a priori peuvent ensuite être intégrées dans le modèle structurel qui sert à décrire l'évolution des concentrations dans le plasma au cours du temps. La modélisation classique consiste à considérer l'organisme comme un ensemble de compartiments dans lesquels la ou les molécule(s) considérée(s) sont absorbées, échangées, transformées, ou éliminées. De manière générale, les modèles PK peuvent être écrits sous forme d'équations différentielles. Ces modèles permettent d'estimer la concentration plasmatique $C(t)$.

Pour étudier les relations entre les concentrations d'une molécule et l'efficacité antivirale, le modèle pharmacodynamique utilisé est le modèle dit E_{\max} . Ce modèle postule un lien direct entre la concentration plasmatique $C(t)$ et l'efficacité antivirale ε qui est directement proportionnel à la quantité de récepteurs occupés, et l'effet maximal (E_{\max}) est atteint quand tous les récepteurs sont saturés. $\varepsilon(t)$ dépend alors de $C(t)$ selon l'équation suivante :

$$\varepsilon(t) = E_{\max} \times \frac{C(t)}{C(t) + EC_{50}}$$

où EC_{50} est la concentration du médicament correspondant à 50% de l'effet maximal. Elle représente l'activité de la molécule : plus elle est faible, plus la puissance de la substance est grande.

Il est possible de prendre en compte l'effet de plusieurs molécules simultanément. Dans le cas où les mécanismes d'action sont différents et indépendants, il est raisonnable de faire l'hypothèse de l'additivité des efficacités des molécules (c'est le cas des molécules impliquées dans les trithérapies (Pawlotsky et al. 2004; Rong et al. 2010)). Le modèle utilisé est alors le modèle de Bliss où l'efficacité totale s'écrit pour deux molécules :

$$\varepsilon_{tot} = 1 - (1 - \varepsilon_1)(1 - \varepsilon_2).$$

Pour étudier les relations entre les concentrations et la tolérance (évolution d'une quantité biologique $R(t)$ en jouant sur sa production ou sur son élimination) le modèle le plus simple est le modèle de réponse indirecte (ou turnover model) où on modélise cette quantité par un modèle à un compartiment avec un taux de production R_{in} et une élimination de vitesse k_{out} (Jusko et Ko 1994) (Figure 7).

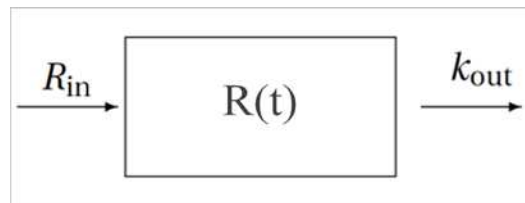


Figure 7 : modèle de réponse indirecte.

En l'absence du médicament, les équations du modèle s'écrivent :

$$\frac{dR(t)}{dt} = R_{in} - k_{out} \times R(t)$$

A l'équilibre, $R_0 = R_{in}/k_{out}$. Le médicament peut induire une inhibition ou une stimulation de la production ou de l'élimination (Dayneka et al. 1993). Par exemple, un modèle de réponse indirecte induisant une inhibition de la production s'écrit :

$$\frac{dR(t)}{dt} = R_{in} \times \left(1 - \left(\frac{E_{max}C(t)}{C(t) + EC_{50}} \right) \right) - k_{out} \times R(t)$$

1.7. Modèles non-linéaires à effets mixtes

Les modèles non-linéaires à effets mixtes (MNLEM) sont des approches globales permettant d'analyser simultanément les données longitudinales de l'ensemble des sujets, en tenant compte de covariables, qui permettent d'expliquer une partie des différences entre sujets. Cette approche, encore appelée "approche de population" a été initialement utilisée dans les analyses pharmacocinétiques (Sheiner et al. 1972, 1977). Cette approche permet d'estimer les caractéristiques de population, *i.e.* la moyenne et la variabilité entre les sujets (dite inter-sujet) et celle des paramètres d'un même sujet au cours du temps (dite intra-sujet), même dans le cas de données individuelles éparses. Appropriée pour exploiter la richesse des données répétées elle est de plus en plus utilisée dans les analyses de charges virales (Perelson et Ribeiro 2008). Aujourd'hui, l'analyse de population en pharmacométrie fait l'objet de recommandations de la part des agences du médicament (Food and Drug Administration 1999; EMEA 2006) et fait partie intégrante du dossier d'autorisation pour un nouveau médicament.

Les notations habituelles dans ces modèles sont les suivantes. La charge virale observée chez l'individu i (exprimée en \log_{10} UI/ml), au temps t_{ij} est donnée par :

$$y_{ij} = f(\phi_i, t_{ij}) + e_{ij},$$

$$e_{ij} \sim \mathcal{N}(0, \sigma^2),$$

$$h(\phi_i) = h(\mu) + \sum_1^K \beta_k C_{ik} + \eta_i \text{ avec } \eta_i \sim \mathcal{N}(0, \Omega),$$

où:

- f est le modèle structurel non-linéaire, supposé commun pour tous les individus. f est choisi pour représenter le processus sous-jacent (fonction mathématique décrivant la cinétique virale au cours du temps),
- e_{ij} est l'erreur résiduelle additive (sur la \log_{10} charge virale) suivant une loi normale de moyenne nulle et de variance σ^2 ,
- ϕ_i est le vecteur des paramètres individuels chez l'individu i de longueur p où p est le nombre de paramètres. ϕ_i varie d'un individu à l'autre dans la population. Une partie de

ces variations est expliquée par l'introduction des covariables, le reste est expliqué par les effets aléatoires individuels η_i ,

- h est la transformation (log-normale ou logit) des paramètres,
- μ est le vecteur des effets fixes représentant un effet moyen dans la population,
- C_{ik} est la valeur de la k -ième covariable binaire chez le i -ième individu ($C_i = 0$ pour la classe de référence et $C_i = 1$ sinon),
- β_k est l'effet de la covariable binaire C_k ,
- η_i est le vecteur des effets aléatoires individuels spécifiques de chaque sujet. η_i suit une loi normale de moyenne nulle et de matrice de variance-covariance $\Omega = \text{diag}(\omega_1^2, \dots, \omega_p^2)$.

Nous supposons que e_i et η_i sont indépendants d'un individu à l'autre et que pour un même individu e_i et η_i sont indépendants.

Suite à l'estimation des paramètres de population, les MNLEM permettent donc ensuite l'estimation des effets aléatoires $\hat{\eta}_i$ et donc des paramètres individuels. Des Estimations Bayésiennes Empiriques (EBE) des paramètres individuels sont ensuite obtenues en maximisant la distribution *a posteriori* (MAP) des paramètres, calculée conditionnellement sur la distribution a priori des paramètres et sur la vraisemblance des observations chez l'individu i .

1.7.1. Méthodes d'estimation

Dans les MNLEM, la vraisemblance n'a pas de solution analytique. Des algorithmes d'estimation par maximum de vraisemblance spécifiques ont donc été développés. Les premiers algorithmes étaient basés sur une linéarisation du modèle au premier ordre. Cette linéarisation du modèle permet de se ramener à un modèle linéaire à effets mixtes dont la vraisemblance a une forme explicite. Les plus utilisés reposant sur cette approximation sont les algorithmes itératifs First Order (FO) et First Order Conditional Estimation (FOCE), développées par Sheiner et al. (1972) et Lindstrom et Bates (1990) respectivement. Ces méthodes sont notamment implémentées dans le logiciel NONMEM (Sheiner et Beal 1998). Néanmoins, ces algorithmes ont tendance à produire des estimateurs biaisés et peu précis en présence de large variabilité individuelle ou lorsque le nombre d'observations par sujet croît moins vite que le nombre de sujets (Vonesh 1996; Ge et al. 2004). Wolfinger (1993) a par la suite proposé une méthode d'estimation où la vraisemblance est calculée par une approximation de Laplace. L'amélioration de la puissance de calcul des ordinateurs a permis de considérer des méthodes d'estimation plus précises mais aussi plus consommatrices en temps de calcul. Ainsi, la quadrature de Gauss adaptative est un développement de l'approximation de Laplace à un ordre plus élevé dont les nœuds et les

ponds sont déterminés pour mieux couvrir la distribution des effets aléatoires (Pinheiro et Bates 2000). Plus récemment, l'algorithme Stochastic Approximation Expectation Maximisation (SAEM) a été développé par Kuhn et Lavielle (2005). Cette méthode est une version stochastique de l'algorithme EM où les paramètres individuels sont considérés comme les valeurs manquantes. L'étape d'estimation se décompose en une simulation de paramètres individuels avec une méthode de Monte Carlo par chaînes de Markov, suivie du calcul de statistiques suffisantes de la vraisemblance des données complètes. La maximisation de ces statistiques suffisantes permet d'obtenir de nouvelles valeurs des paramètres, réutilisés à la première étape de l'itération suivante jusqu'à convergence de l'algorithme. L'algorithme SAEM est implémenté dans le logiciel MONOLIX (<http://www.lixoft.eu>). L'algorithme SAEM est également implémenté dans le logiciel NONMEM depuis la version 7, dans S-ADAPT depuis la version 1.56 et dans le package R saemix (www.saemix.biostat.fr) depuis juillet 2011 (Comets et al. 2011).

Au cours de cette thèse, nous utiliserons l'algorithme SAEM implémenté dans MONOLIX.

1.7.2. Prise en compte des charges virales sous la limite de detection

Comme nous l'avons déjà souligné dans la partie 1.1.3 ce chapitre, les données de charge virale sont sujettes à une LOD. Les charges virales sous la LOD représentent une proportion de plus en plus importante au cours du traitement du fait d'une plus grande efficacité antivirale des nouvelles trithérapies.

Plusieurs procédures ont été proposées pour contourner ce problème dans le domaine du VIH et du VHC. La procédure la plus naïve consiste à omettre l'ensemble des données sous la LOD. D'autres méthodes proposent d'imputer ces données par une valeur fixe, habituellement la valeur de la LOD ou à sa moitié (LOD/2) mais les biais engendrés dans l'estimation des paramètres par ces approximations peuvent être importants (Hing et al. 2001; Lynn 2001; Duval et Karlsson 2002). Pour éviter ce biais, certains auteurs recommandent de ne garder que la première valeur censurée imputée à LOD/2 (Beal 2001).

Différentes méthodes d'estimation ont été proposées pour estimer les paramètres pour les modèles linéaires mixtes permettant de prendre en compte ces données sous la LOD en les considérant comme des données censurées à gauche (Hughes 1999; Jacqmin-Gadda et al. 2000).

Puis ces approches basées sur le maximum de vraisemblance ont été proposées dans le cadre des MNLEM. Dans ce cas, l'observation disponible n'est pas la variable Y_{ij}

mais le couple $(Y_{ij}^{obs}, \delta_{ij})$ où δ_{ij} est une variable binaire de censure et la variables Y_{ij}^{obs} est définie par :

$$Y_{ij}^{obs} = \max(LOD, Y_{ij}) = \begin{cases} Y_{ij} & \text{si } \delta_{ij} = 1 \\ LOD & \text{si } \delta_{ij} = 0 \end{cases}$$

Les méthodes M3 et M4 ont été développées dans le cadre de l'approximation de Laplace dans le logiciel NONMEM (Ahn et al. 2008). Avec la méthode M3, la probabilité des données sous la LOD est obtenue par intégration sous la LOD. Et la méthode M4 est identique mais conditionnée sur le fait que l'observation doit être supérieure à 0.

Une approche similaire a également été développée avec l'extension de l'algorithme SAEM dans logiciel MONOLIX. Un algorithme de Gibbs hybride comprenant la simulation des données censurées à partir d'une distribution gaussienne tronquée à droite a été combiné à l'algorithme SAEM. Une estimation de l'espérance des données censurées conditionnellement aux données observées a également été proposée (Samson et al. 2006; Panhard et Samson 2009).

Plusieurs étude de simulation ont montrés que la prise en compte correcte des données sous la LOD par MNLEM permet de réduire les biais dans l'estimation des paramètres par rapport aux approches empiriques (Hing et al. 2001; Duval et Karlsson 2002; Thiébaud et al. 2006; Bergstrand et Karlsson 2009; Yang et Roger 2010).

1.7.3. Tests statistiques

Un des principaux tests utilisés dans les MNLEM pour détecter l'effet d'une covariable est le test de Wald portant sur les paramètres de population qui repose sur les erreurs d'estimation et permet d'évaluer la significativité du coefficient d'effet estimé ($\hat{\beta}$) par le modèle incluant la covariable. La statistique du test de Wald est calculée en divisant le coefficient estimé par son erreur standard estimée ($SE_{\hat{\beta}}$). Avec l'algorithme SAEM les erreurs standard sont calculées par la linéarisation de la matrice d'information de Fisher. L'hypothèse nulle $H_0 : \{\beta=0\}$ est rejetée au risque 5% si $\left| \frac{\hat{\beta}}{SE_{\hat{\beta}}} \right| > 1,96$.

Une alternative au test de Wald est le test du rapport de vraisemblance (LRT) qui permet de comparer les vraisemblances des modèles avec et sans la covariable. La différence entre les vraisemblances de 2 modèles suit une loi du χ^2 à $|p_2 - p_1|$ degrés de liberté, p_1 et p_2 étant le nombre de paramètres estimés de chaque modèle. Cependant le LRT nécessite de calculer la vraisemblance en utilisant des méthodes d'échantillonnage

préférentiel (*important sampling*) ce qui se traduit par un temps de calcul beaucoup plus élevé.

Plusieurs travaux ont évalué l'erreur de type I et la puissance de ces tests dans le contexte des études de pharmacocinétique de population. Dans le cadre des MNLEM avec l'algorithme SAEM, les propriétés statistiques du test de Wald ne sont conservées qu'asymptotiquement et l'erreur de type I est augmentée significativement lorsque le nombre de sujet est petit (Panhard et al. 2005; Panhard et Samson 2009).

Une solution pour palier à ce risque d'inflation de l'erreur de type I lorsque le design d'une étude correspond à un cas d'éloignement des conditions asymptotiques (petit effectif ou nombre de prélèvements par patient faible) est d'utiliser l'approche par permutation pour déterminer les p-values des covariables (Bertrand et al. 2012). Il s'agit d'une approche non-paramétrique où nous nous affranchissons complètement de la distribution de référence (χ^2) pour construire la distribution de la statistique sous l'hypothèse d'absence d'un effet de la covariable à l'aide de permutation du vecteur de covariables de l'échantillon observé. Pour cela, R jeux de données sont simulés en permutant les lignes de la matrice de covariables du jeu de données observé. La statistique du test Q^{obs} est estimée à partir du jeu de données observé et une statistique Q^{perm} est estimée pour chacun des R jeux de données simulés. Ainsi, nous obtenons $r=1, \dots, R$ Q^{perm}_r , qui constituent la distribution de la statistique sous l'hypothèse nulle d'absence d'effet de la covariable. Au final, la p-value de permutation est égale à la proportion: $(card(Q^{perm}_r \geq Q^{obs}) + 1) / (R+1)$.

1.8. Objectifs de la thèse

Les travaux méthodologiques de cette thèse porte sur l'étude de l'approche par modélisation de la cinétique virale pour l'évaluation des traitements du VHC par simulation d'essais cliniques. Nous avons étudié l'influence du design (nombre de patients et nombre de charges virales par patients) sur l'inflation de l'erreur de type I dans les tests de comparaisons des paramètres estimés dans ces modèles (test de l'effet d'une covariable) et évalué la puissance de ces tests pour détecter une différence d'efficacité de deux traitements. Deux approches sont évaluées l'une en utilisant le test asymptotiques de Wald dans les MNLEM et l'autre avec le test non paramétrique de Wilcoxon sur le déclin de charge virale.

La première partie des travaux appliqués est l'étude par modélisation des relations entre les concentrations plasmatiques des trithérapies et la réponse virologique. Il s'agit de caractériser la pharmacocinétique du Peg-IFN- α , de la ribavirine et des inhibiteurs de protéase (telaprevir ou boceprevir) et d'identifier les facteurs de variabilité à partir des données de l'étude ANRS MODCUPIC, et d'étudier le lien entre la pharmacocinétique et la cinétique virale en modélisant conjointement les concentrations et les charges virales (avec un modèle dit PK/VK).

La deuxième partie des travaux appliqués concerne l'étude par modélisation de la relation entre les concentrations plasmatiques des trois molécules et la tolérance des trithérapies à partir des données de l'étude ANRS MODCUPIC.

Cette étude de la pharmacocinétique des trithérapies (Peg-IFN- α , ribavirine et inhibiteurs de protéase), et de leurs variabilités individuelles, permettra de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la variabilité de la réponse virologique des patients VHC à un stade avancé de la maladie (cirrhotiques et non-répondeurs à une bithérapie antérieure).

2. Évaluation par simulation des tests de comparaison de traitements dans les modèles non-linéaires à effets mixtes

2.1. Résumé

Nous avons vu dans l'introduction que la modélisation mathématique de la cinétique virale sous traitement est une approche prometteuse pour l'évaluation de l'efficacité antivirale *in vivo* des traitements et la comparaison des stratégies thérapeutiques. L'estimation des paramètres de ces modèles est complexe et nécessite des prélèvements fréquents de charge virale. En dehors des essais cliniques sponsorisés par l'industrie, il est parfois difficile d'inclure un grand nombre de patients et d'avoir des mesures de charges virales très fréquentes.

Nous avons mené une étude de simulation d'essais cliniques en condition réelle d'utilisation pour évaluer la puissance des tests de comparaison de l'efficacité antivirale entre deux groupes de patients traités par trithérapie comprenant un inhibiteur de protéase en faisant varier le nombre de patients par groupe, le nombre de charges virales par patient et la différence attendue entre les efficacités antivirales.

Nous avons considéré le modèle standard de décroissance virale (Neumann et al. 1998). Dans cette étude, nous avons considéré la cinétique virale initiale (14 premiers jours) et donc nous avons fait l'hypothèse que le nombre de cellules cibles (T) est constant au cours de la durée de l'étude et reste identique à la valeur pré-traitement $T_0 = c\delta/bp$ (Guedj et al. 2012a, 2012b). Ce modèle comprend donc 4 paramètres biologiques : la charge virale initiale (V_0), les taux de clairance du virus (c) et des cellules infectées (δ) et l'efficacité antivirale du traitement (ϵ), qui est le pourcentage de blocage de la production virale. Les valeurs moyennes des paramètres et leur variabilité dans la population sont issues de l'analyse de patients traités par telaprevir en monothérapie (Guedj et Perelson 2011).

Un effet traitement sur l'efficacité antivirale a été ajouté reflétant une même efficacité (H_0 *i.e.*, effet traitement nul) ou une efficacité différente (H_1 *i.e.*, effet traitement non nul) entre les 2 trithérapies (notées A et B) et nous avons fixé $\epsilon^A=99.9\%$ et $\epsilon^B=99\%$, 99,5%, 99,8% ou 99,9%. Différents scénarii ont été envisagés en faisant varier le nombre de charges virales par patients pendant les 14 premiers jours après l'initiation du traitement ($n = 5$ ou 7) et le nombre de patients par groupe ($N = 10, 14, 20, 28, 30$ ou 42). Avec le logiciel R, 500 jeux de données ont été simulés pour chaque scénario. Nous avons fixé une LOD à 12 UI/ml.

Les paramètres ont été estimés par MNLEM à l'aide de l'algorithme SAEM implémenté dans le logiciel MONOLIX v4.0. La précision des paramètres estimés a été évaluée par le calcul des erreurs d'estimation relatives à partir desquelles les biais relatifs (RB) et les erreurs quadratiques moyennes relatives (RRMSE) ont été déduites. Nous avons comparé la précision d'estimation des paramètres entre deux approches suivant qu'une LOD était simulée ou non : i) l'approche « all data » où toutes les charges virales simulées ont été conservées sans LOD, ii) et l'approche « ML » (pour Maximum Likelihood) où les charges virales sous la LOD ont été censurées et estimées par l'algorithme SAEM.

Nous avons évalué l'erreur de type I (pourcentage de jeux de données simulés où la p-value est $< 0,05$ sous H_0) et la puissance (pourcentage de jeux de données simulés où la p-value est $< 0,05$ sous H_1) du test asymptotique de Wald dans les MNLEM (comparaison de l'efficacité antivirale) et du test non paramétrique de Wilcoxon (comparaison du déclin de charge virale entre J0 et J14, avec une imputation des données sous la LOD à sa moitié). Tel que décrit dans la partie 1.7.3, une inflation de l'erreur de type I avec le test de Wald en cas d'éloignement des conditions asymptotiques (petit effectif ou nombre de prélèvement par patient faible) était attendue et nous avons donc utilisé l'approche par permutation pour le calcul de puissances corrigées.

Les résultats de notre étude de simulation ont permis de montrer une estimation précise des paramètres de cinétiques virales du VHC estimés sous trithérapie même avec une LOD. Nous avons également montré une bonne puissance pour détecter une différence d'efficacité antivirale entre deux trithérapies même en présence d'une grande proportion de données sous la LOD ou d'un faible nombre de patients par groupes. De plus, cette étude illustre à nouveau que l'analyse par modélisation de l'ensemble des charges virales avec des MNLEM permet d'avoir une meilleure puissance pour détecter une différence d'efficacité de deux traitements par rapport aux approches statistiques standard habituellement utilisées dans les essais thérapeutiques (comparaison du déclin de charge virale).

L'ensemble de ce travail a fait l'objet d'une publication en 2013 dans le journal *BMC Medical Research Methodology*.

2.2. Article 1 : *BMC Medical Research Methodology*

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Clinical trial simulation to evaluate power to compare the antiviral effectiveness of two hepatitis C protease inhibitors using nonlinear mixed effect models: a viral kinetic approach

Cédric Laouénan^{1,2*}, Jeremie Guedj¹ and France Mentre^{1,2}

Abstract

Background: Models of hepatitis C virus (HCV) kinetics are increasingly used to estimate and to compare *in vivo* drug's antiviral effectiveness of new potent anti-HCV agents. Viral kinetic parameters can be estimated using non-linear mixed effect models (NLMEM). Here we aimed to evaluate the performance of this approach to precisely estimate the parameters and to evaluate the type I errors and the power of the Wald test to compare the antiviral effectiveness between two treatment groups when data are sparse and/or a large proportion of viral load (VL) are below the limit of detection (BLD).

Methods: We performed a clinical trial simulation assuming two treatment groups with different levels of antiviral effectiveness. We evaluated the precision and the accuracy of parameter estimates obtained on 500 replication of this trial using the stochastic approximation expectation-maximization algorithm which appropriately handles BLD data. Next we evaluated the type I error and the power of the Wald test to assess a difference of antiviral effectiveness between the two groups. Standard error of the parameters and Wald test property were evaluated according to the number of patients, the number of samples per patient and the expected difference in antiviral effectiveness.

Results: NLMEM provided precise and accurate estimates for both the fixed effects and the inter-individual variance parameters even with sparse data and large proportion of BLD data. However Wald test with small number of patients and lack of information due to BLD resulted in an inflation of the type I error as compared to the results obtained when no limit of detection of VL was considered. The corrected power of the test was very high and largely outperformed what can be obtained with empirical comparison of the mean VL decline using Wilcoxon test.

Conclusion: This simulation study shows the benefit of viral kinetic models analyzed with NLMEM over empirical approaches used in most clinical studies. When designing a viral kinetic study, our results indicate that the enrollment of a large number of patients is to be preferred to small population sample with frequent assessments of VL.

Keywords: Hepatitis C virus, Non-linear mixed effect models, Early viral kinetics, Protease inhibitor, Mathematical modeling, Direct-acting antiviral agents

* Correspondence: cedric.laouenan@inserm.fr

¹INSERM, UMR 738, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris F-75018, France

²AP-HP, Hôpital Bichat, Service de Biostatistique, Paris F-75018, France

Background

Chronic infection with Hepatitis C Virus (HCV) affects 130–200 million people worldwide [1]. It is the leading cause of cirrhosis, liver cancer and liver transplants which result in 350,000 deaths worldwide [2]. HCV is divided into 6 genotypes, with genotype 1 being the hardest to treat and the most prevalent in Western countries. The goal of treatment is to achieve a sustained virologic response (SVR), marker of viral eradication, assessed by a viral load HCV RNA (VL) below the limit of detection (LOD) six months after cessation of therapy. Until 2011, the only available treatment was based on weekly injections of pegylated interferon (peg-IFN) and daily oral ribavirin (RBV) during 48 weeks, with SVR rate lower than 50% in treatment-naïve HCV genotype 1 patients [3].

In 2011, the approval of two protease inhibitors (PI), telaprevir and boceprevir, in combination with peg-IFN/RBV (triple therapy), marked a milestone for anti-HCV therapy with SVR rates larger than 70% in treatment-naïve HCV genotype 1 patients [4,5]. Dozens of compounds targeting different viral proteins are currently in different stages of clinical trials, raising the expectation that several IFN-free regimens might be available in the coming years.

Viral kinetic modeling aims at characterizing the main mechanisms that govern the virologic response to treatment using mathematical models. Following the recommendations of the Food and Drug Administration [6], this approach has been increasingly used in phase 1/2 of clinical development to estimate viral kinetic parameters and to evaluate drug antiviral effectiveness *in vivo* [7,8]. Parameter estimation is often achieved using non-linear mixed effect models (NLMEM) [9]. The popularity of this approach is due to the fact that it optimizes the information available by borrowing strength from the whole sample to provide precise estimation of the parameters, including covariate effects [10–12]. Moreover it naturally accounts for the information brought by VL data below the limit of detection (BLD) and reduces the bias in parameter estimation as compared to empirical approaches where BLD data are ignored or assigned to half the LOD [10,13,14].

So far, viral kinetic models and NLMEM have mostly been used in phase 1/2 clinical trials with large number of patients and/or frequent assessment of VL data within each patient. However in most clinical trials, in particular when they are not sponsored by the industry, it is not possible to hospitalize patients and to get frequent viral load samples. In this challenging context, the capacity of NLMEM to precisely estimate viral kinetic parameters is not known. In particular the performance of tests used to assess the effect of a covariate which have good asymptotic properties (Wald test, likelihood ratio test or score test) is not warranted when one is far from the asymptotic conditions. For instance an inflation of

the type I error has been reported in another clinical context where data were sparse [15]. With the new potent triple therapies against HCV the amount of information available may also be limited by the fact that a large proportion of VL data are below LOD.

Here our goal was to evaluate the capacity of NLMEM to precisely estimate the parameters of viral kinetic models when there is a large proportion of BLD data and a limited number of data per patient. In particular we aimed to evaluate by simulation the type I errors and the power of the Wald test to compare the antiviral effectiveness of two groups receiving different triple therapies (noted PI-A and PI-B in the following). Parameter estimation and Wald test property were evaluated according to the number of patients, the number of samples per patient and the expected difference in antiviral effectiveness between the two treatment groups.

Methods

Viral kinetic model

We used the standard biphasic model of HCV kinetics defined by the following set of differential equations [16]:

$$\begin{cases} \frac{dI}{dt} = bVT - \delta I \\ \frac{dV}{dt} = p(1-\varepsilon)I - cV \end{cases} \quad (1)$$

where T represents the density of target cells that can be infected by virus measured as HCV RNA (V), with rate constant b . In the model, infected cells (I) die or lose their infected state with rate constant δ and produce virions at constant rate p per cell. Virions are assumed to be cleared with rate constant c . As it is done usually when considering short term VL data we assumed that the target cell level is constant throughout the study period and remains at its pre-treatment steady state value $T_0 = c\delta/pb$ [17,18].

Treatment is assumed to reduce the average rate of viral production per cell from p to $p(1-\varepsilon)$, where ε represents the constant drug effectiveness, *i.e.*, $\varepsilon = 0.990$ implying the drug is 99% effective in blocking viral production. If all parameters including treatment effectiveness are constant over time this model predicts that VL will fall in a biphasic manner [16], with a rapid first phase of viral decline with rate approximately equal to c lasting for a couple of days and with the magnitude viral decline depending on ε , and a second slower but persistent second phase of viral decline with rate $\varepsilon\delta$. Hence, for potent therapies for which ε is close to 1, the second-phase slope will be approximately δ .

Lastly mathematical analysis shows that if ε is constant, p and b do not intervene in the VL equation and thus were ignored in the following without loss of generality [19].

Statistical model

We assumed an additive error (σ) on the \log_{10} of the VL observations, i.e., the observed data y_{ij} for patient i at time t_{ij} is given by:

$$y_{ij} = f(\phi_i, t_{ij}) + e_{ij}, \quad (2)$$

$$e_{ij} \sim N(0, \sigma^2), \quad (3)$$

$$h(\phi_i) = \mu + \beta T_i + \eta_i \text{ with } \eta_i \sim N(0, \Omega), \quad (4)$$

where:

- f is the non-linear model,
- ϕ_i is the vector of individual parameters of length p where p is the number of parameters,
- e_{ij} is the residual error assumed to follow a normal distribution with mean 0 and variance σ^2 ,
- h is the transformation of the vector of parameters that make them normally distributed,
- μ is the vector of fixed effects,
- β is the vector of coefficient of the only covariate studied i.e. the difference of effectiveness between PI-A and PI-B (with $T_i = 0$ if treatment is PI-A and $T_i = 1$ if treatment is PI-B),
- η_i is the vector of random effects independent of e_{ij} and are supposed to be independent, with diagonal variance-covariance matrix $\Omega = \text{diag}(\omega_1^2, \dots, \omega_p^2)$.

It is assumed that h is the logarithm transformation for V_0 , δ and c and the logit transformation for ϵ .

Parameter values

Mean parameter values, inter-individual standard deviations (ω) and standard deviation of residual error, σ , for patients treated with PI-A were assumed to be similar to those found in phase 1 of clinical trials with telaprevir at steady state [7] (Table 1). We assumed that PI-A immediately reached its steady state level of effectiveness, with mean $\epsilon^A = 0.999$. Similar parameter distribution was assumed in patients treated with PI-B, except for the mean antiviral effectiveness of PI-B, ϵ^B . We considered several values for ϵ^B equal to 0.999, 0.998, 0.995 and 0.990, corresponding to a similar, 2-fold, 5-fold and 10-fold lower levels in the blocking of viral production than PI-A, respectively. The LOD was fixed to 12 IU/mL [20].

Clinical trial simulation

We considered different designs in real-life setting, i.e., with a limited number of VL measurements per patient. Two schedules for the VL assessments were considered, called “7 VL” and “5 VL” in the following. “7 VL” had seven VL measurements at days 0, 0.33, 1, 2, 3, 7 and 14 whereas “5 VL” was sparser and did not have the early measurements at days 0.33 and 1 that are often difficult to obtain in clinical practice. Then different scenarios were considered according to the number of VL measurements (n) and the number of patients per group of treatment (N). In order to have designs that could be easily compared, we considered different designs with 5 VL or 7 VL but constant total numbers of observations per group $n_{\text{tot}} = N \times n$. We considered small sample size with: $n_{\text{tot}} = 50$ ($N = 10$ and $n = 5$) and $n_{\text{tot}} = 70$ ($N = 10$ and $n = 7$ or $N = 14$ and $n = 5$), middle sample size with: $n_{\text{tot}} = 100$ ($N = 20$ and $n = 5$) and $n_{\text{tot}} = 140$ ($N = 20$ and $n = 7$ or $N = 28$ and $n = 5$) and larger sample size with: $n_{\text{tot}} = 150$ ($N = 30$ and $n = 5$) and $n_{\text{tot}} = 210$ ($N = 30$ and $n = 7$ or $N = 42$ and $n = 5$). For each scenario, $K = 500$ dataset were generated using R software version 2.15.0 (R foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Examples of simulated dataset with the design $N = 30$ and $n = 7$ and the different levels of antiviral effectiveness considered with the percentage of patients below the LOD at day 3, 7 and 14 is shown in Figure 1.

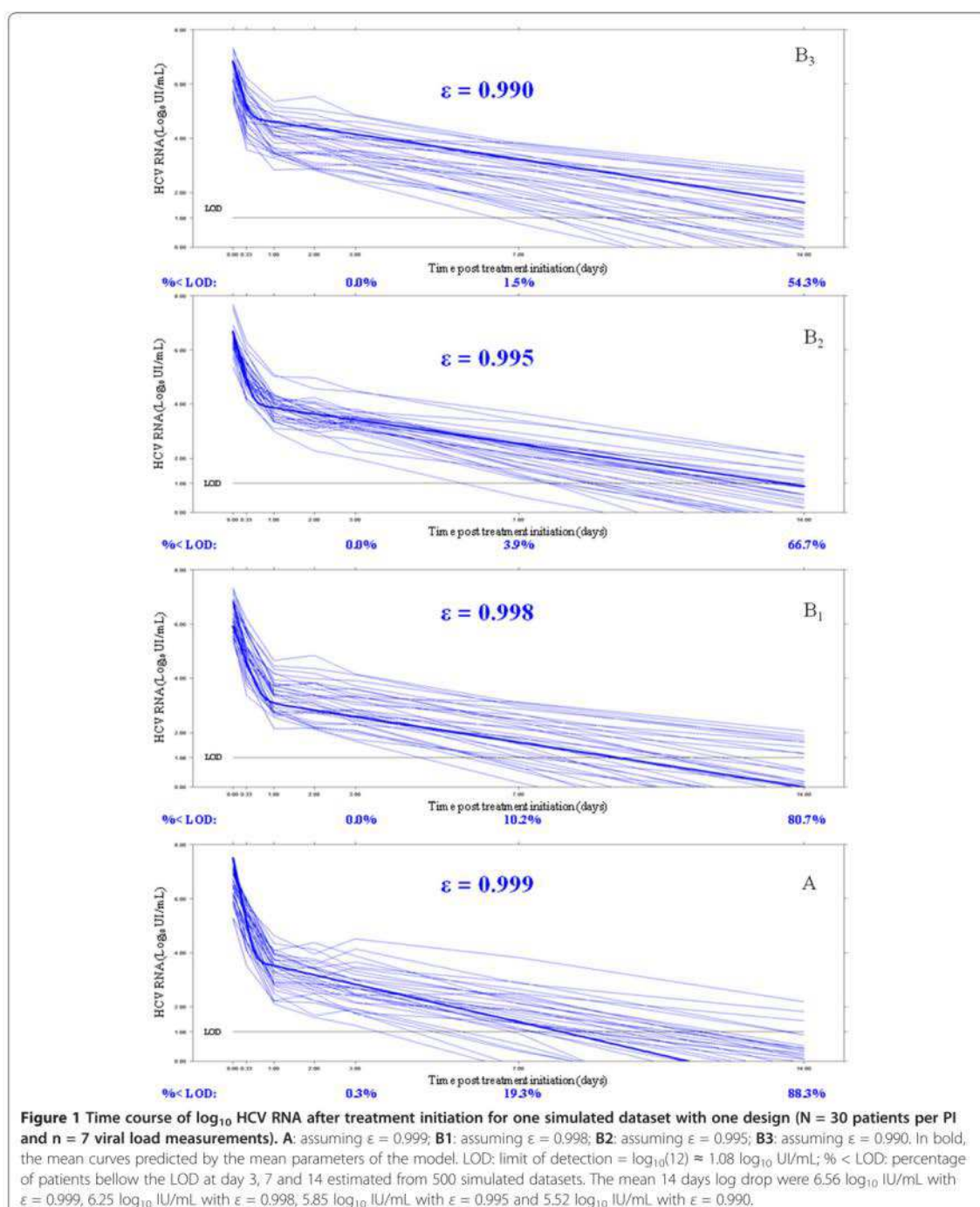
Parameter estimation

Data of each simulated trial were analyzed using MONOLIX version 4.2 (<http://www.lixoft.eu/monolix/product-monolix-overview/>) [21], a software devoted to maximum likelihood estimation of parameters in NLMEM using an extension of the stochastic approximation expectation-approximation (SAEM) algorithm [22,23]. Of note one advantage of maximum likelihood estimation (noted “ML” in the following) is that it takes into account the information brought by BLD data [10]. We compared accuracy and precision of parameter estimations obtained with those that would be obtained if all data were observed with no BLD data at all (referred as “all data”).

For each scenario, relative estimation errors REE ($\hat{\theta}_k$), $k = 1, \dots, K$ were computed as shown in equation (5),

Table 1 Value, distribution and inter-individual standard deviation of population parameters from data with patients treated by monotherapy of PI-A [7]

	V_0 (IU/mL)	c (day ⁻¹)	δ (day ⁻¹)	ϵ	σ (log ₁₀ IU/mL)
Fixed effect	2.68 10 ⁶	13.4	0.58	0.999	0.19
Transformation	lognormal	lognormal	lognormal	logistic-normal	-
Inter-individual standard deviation (ω)	1.09	0.25	0.25	0.61	-



where $\hat{\theta}_k$ is the parameter estimated for the k^{th} replicate and θ^* the true parameter value used to generate the data.

$$REE(\hat{\theta}_k) = \frac{\hat{\theta}_k - \theta^*}{\theta^*} \times 100 \quad (5)$$

Each REE_k was expressed in percent. We plotted the boxplot of the REE with the 10% and 90% percentiles. Then, from the REE, the relative bias (RB) and the relative root mean square error (RRMSE) were computed as shown in equation (6) and (7).

$$RB(\hat{\theta}_k) = \frac{1}{K} \sum_{k=1}^K REE(\hat{\theta}_k) \quad (6)$$

$$RRMSE(\hat{\theta}_k) = \sqrt{\frac{1}{K} \sum_{k=1}^K REE(\hat{\theta}_k)^2} \quad (7)$$

The accuracy and the precision of parameter estimates were evaluated using RB and RRMSE, respectively.

Detection of a difference in antiviral effectiveness

We analyzed for each scenario the ability to detect a difference of antiviral effectiveness between the two PIs. Given that treatment antiviral effectiveness was estimated on a logistic scale we defined accordingly the difference of effectiveness between the two PIs, β , as $\beta = \text{logit}(\epsilon^A) - \text{logit}(\epsilon^B)$. For each simulated dataset, the estimated value of β , $\hat{\beta}$, was obtained along with its (estimated) standard error, $SE_{\hat{\beta}}$. Then the Wald test statistics given by $\frac{\hat{\beta}}{SE_{\hat{\beta}}}$ was calculated and the null hypothesis " $H_0: \beta = 0$ " was rejected at the level of 5% if $\left| \frac{\hat{\beta}}{SE_{\hat{\beta}}} \right| > 1.96$. Thus in scenarios where $\epsilon^A = \epsilon^B = 0.999$ and therefore $\beta = 0$, the type I error was given by the proportion of dataset among the 500 simulated that led to reject H_0 . Similarly the power to detect a difference in treatment antiviral effectiveness was calculated in scenarios where $\beta \neq 0$ and was given by the proportion of datasets among the 500 simulated that led to reject H_0 . With $\epsilon^A = 0.999$ and with values of ϵ^B equal to 0.998, 0.995 and 0.990, β were equal to 0.7, 1.6 and 2.3, respectively. Type I error and power were evaluated with all designs describe above and consistent with previous analysis [15,24], we expect an inflation of the type I error with the Wald test. To ensure a type I error of 5%, we define for each design a correction threshold as the 5th percentile of the distribution of the p-values of the test under H_0 for the 500 simulated dataset. Then we used that corrected threshold as a limit of significance in the evaluation of the tests under H_1 to compute the corrected power [15,25]. Furthermore we evaluated type I error with 2 larger sample size to approach asymptotic conditions with: $n_{\text{tot}} = 350$ ($N = 50$ and $n = 7$) and $n_{\text{tot}} = 700$ ($N = 100$ and $n = 7$). Lastly, the power to detect a difference in treatment effectiveness between the two PIs was

compared with the one obtained by standard empirical approaches where the difference in viral decline at day 14 between two treatments is tested by a non parametric two-sided Wilcoxon test.

Results

Parameter estimation

First we evaluated the impact of having a large proportion of BLD data on the precision of parameter estimates. Proportions of BLD data were equal to 19.3% and 88.3% at days 7 and 14 with $\epsilon = 0.999$, 10.2% and 80.7% with $\epsilon = 0.998$, 3.9% and 66.7% with $\epsilon = 0.995$, 1.5% and 54.3% with $\epsilon = 0.990$, respectively (Figure 1). For that purpose we compared the parameters estimation with all data or ML with the design $N = 30$ and $n = 7$ and assuming a lower effectiveness for PI-B than PI-A ($\epsilon^A = 0.999$ vs $\epsilon^B = 0.990$).

Assuming all data, *i.e.*, all data can be observed and there is no LOD, all the parameter estimates had a very small RB lower than 1% and 11% for the fixed effects and the inter-individual variance parameters, respectively. Similarly, the RRMSE were lower than 10% and 33% for the fixed effects and the inter-individual variance parameters, respectively (Table 2). Yet, the precision of both the fixed effect and inter-individual variance parameters were very close to those found with the ML uncensored data (Table 2), showing the relevance of maximum likelihood in the handling of censored data. Similar results were obtained when comparing the distribution of the REE from the 500 simulated datasets (Figure 2). Equally good performance was obtained when considering sparser sampling design with $n = 5$ VL measurements per patient except for the viral clearance rate, c (Table 2 and Figure 2) [11].

Type I error of the Wald test

Next we evaluated the type I error of the Wald test according to different designs and assuming $\epsilon^A = \epsilon^B = 0.999$ (Figure 3). A type I error of 14.4% was found with ML data, $n = 5$ VL and $N = 10$ showing that the asymptotic conditions under which the Wald test is valid were not met with this design. In fact a minimal number of observations per group $n_{\text{tot}} = 140$ was necessary in order to achieve a type I error less than 10% and $n_{\text{tot}} = 700$ ($N = 100$ and $n = 7$) were needed for type I error to be in the 95% prediction interval around 5% [3.1%; 6.9%] with ML data. Of note, for a given value of N , the number of VL measurements did not substantially change the type I error (Figure 3) and increasing the number of patients N was more beneficial than having more frequent VL assessments within each patient. For instance the type I error was lower with the design $N = 14$ and $n = 5$ than with the design $N = 10$ and $n = 7$ (Figure 3) although the total number of observation per patient n_{tot} was the same and equal to 70. In addition to the influence of the number of

Table 2 Relative bias (RB) (%) and relative root mean square error (RRMSE) (%) of the estimated parameters evaluated from 500 simulated datasets

	All data (n = 7 VL)		ML (n = 7 VL)		ML (n = 5 VL)	
	RB (%)	RRMSE (%)	RB (%)	RRMSE (%)	RB (%)	RRMSE (%)
$\log_{10}(V_0)$ (IU/mL)	0.1	1.0	0.2	1.0	0.1	1.0
c (day ⁻¹)	1.0	4.3	0.6	4.1	34.1	78.8
δ (day ⁻¹)	0.2	3.2	0.8	3.7	0.6	3.7
$-\log_{10}(1-\varepsilon)$	0.1	3.2	0.4	3.1	0.3	3.6
β	0.4	8.5	-0.5	8.5	0.4	9.9
$\omega^2_{V_0}$	-0.4	18.9	-1.0	19.0	-0.5	19.3
ω^2_c	-4.6	31.5	-10.9	32.9	236.6	358.3
ω^2_δ	-3.0	19.8	-2.3	24.5	-2.4	24.9
ω^2_ε	-2.6	32.2	-4.5	32.0	-9.9	36.3
σ	-0.03	5.3	-0.7	6.2	-1.3	8.0

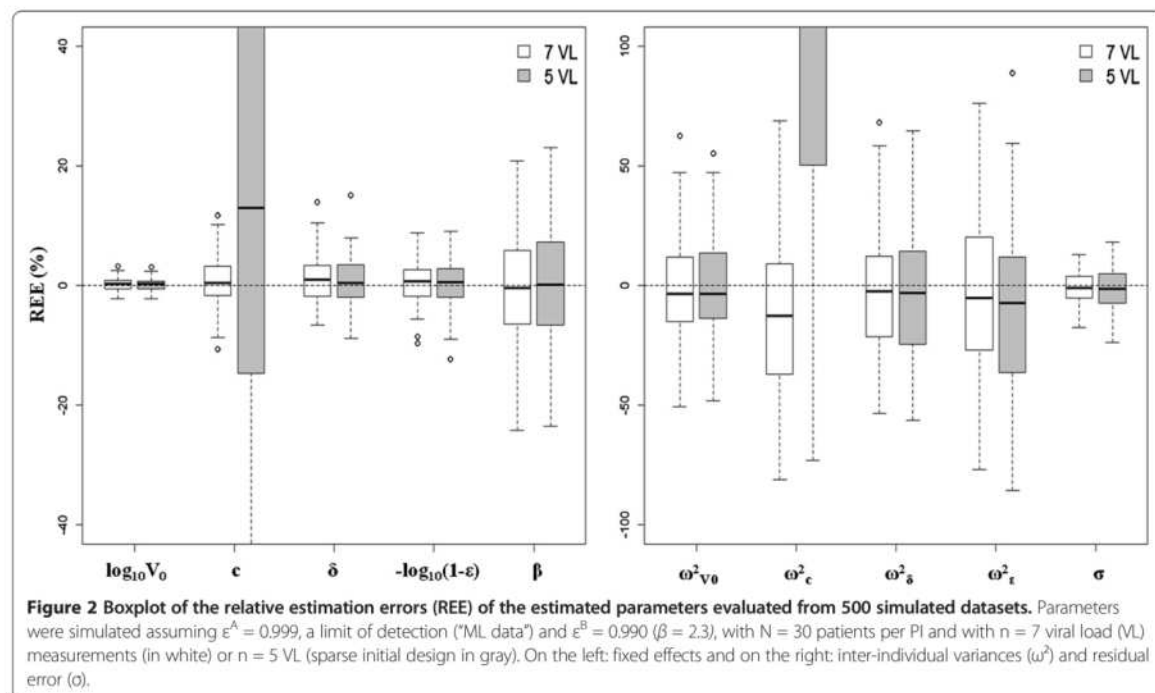
Parameters were simulated with N = 30 patients per group assuming $\varepsilon^A = 0.999$ and $\varepsilon^B = 0.990$, no limit of detection ("All data") or a limit of detection at 12 IU/mL ("ML"), and with n = 7 or 5 viral load (VL) measurements per patient.

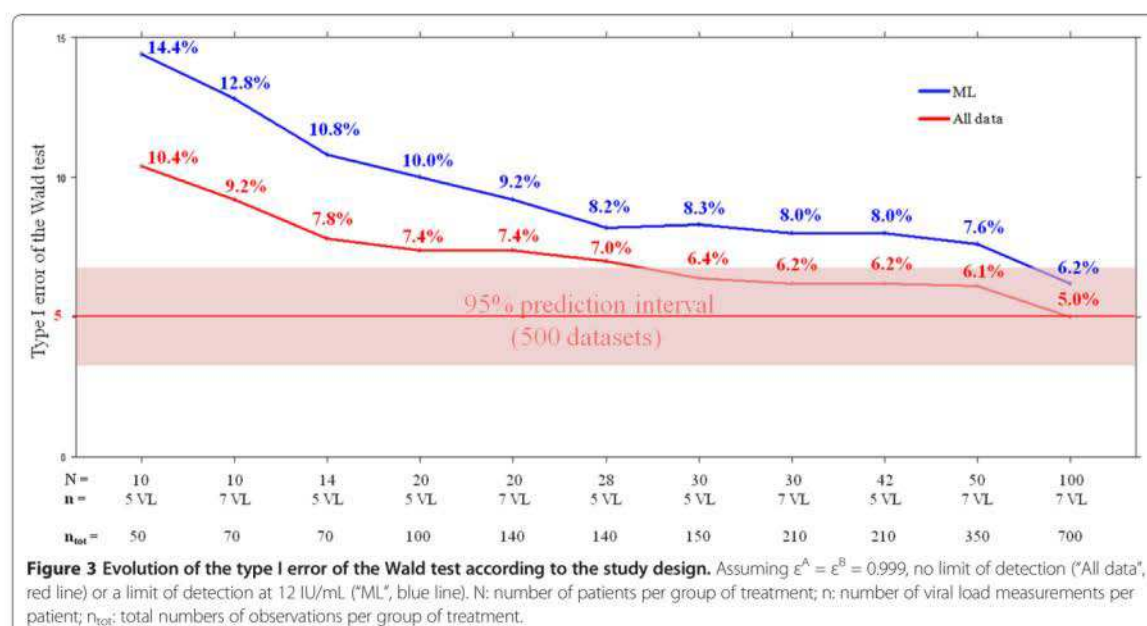
patients, the type I error was also deteriorated by the presence of a large proportion of BLD data, even if they were taken into account appropriately. Indeed type I errors were consistently smaller when assuming that there was no LOD ("all data"). As shown in Figure 3, the type I error was equal to 10.4% with all data, N = 10 and n = 5 compared to 14.4% with ML data.

Power to detect a difference in antiviral effectiveness

Next, we evaluated the power to detect a difference of effectiveness between the two PIs assuming $\varepsilon^A = 0.999$

and lower values of ε^B equal to 0.998, 0.995 and 0.990 with different designs. Except when both effectiveness were close (*i.e.*, $\varepsilon^B = 0.998$), the power of the Wald test, corrected or not (see methods), was larger than 95%, regardless of the number of sampling VL measurements and the number of patients per PI (Table 3). As found for the type I error, increasing the number of patients N was more beneficial than having more frequent VL assessments within each patient. For instance power was higher with the design N = 28 and n = 5 than with the design N = 20 and n = 7 (Table 3) although the total





number of observation per patient n_{tot} was the same and equal to 140.

Lastly, we compared these results with the power achieved by comparing the mean viral decline at day 14 between both groups using a Wilcoxon test. The power of Wilcoxon test was on average lower of 44% as compared to the one achieved with viral kinetic model and NLMEM with $\epsilon^B = 0.995$ or 0.998 (Table 3). Even when

PI-B's and PI-A's antiviral effectivenesses were assumed to be 0.990 and 0.999, respectively, corresponding to a 10-fold difference in the viral production under treatment, the power of the Wilcoxon test was only equal to 67% with $N = 30$, compare to 100% with the Wald test (Table 3). It should be noted that the type I error of the Wilcoxon test, which is a non parametric test, was not inflated (5.2% with the design $N = 10$ for example).

Table 3 Power (%) to detect a difference of effectiveness between PI-A and PI-B according to the study design and the effectiveness of PI-B (ϵ^B), assuming $\epsilon^A = 0.999$ and a limit of detection ("ML data")

		ϵ^B	0.998	0.995	0.990	0.998	0.995	0.990	0.998	0.995	0.990
Small sample size	Design*	N = 10 and n = 7			N = 14 and n = 5			N = 10 and n = 5			
		$n_{\text{tot}} = 70$			$n_{\text{tot}} = 70$			$n_{\text{tot}} = 50$			
	Wald test (uncorrected)	62.2	99.8	100	61.8	100	100	55.2	98.8	100	
	Wald test (corrected)	44.2	98.4	100	50.4	100	100	35.8	95.8	100	
	Wilcoxon test	6.6	11.2	26.8	4.4	15.6	39.0	6.6	11.2	26.8	
Middle sample size	Design*	N = 20 and n = 7			N = 28 and n = 5			N = 20 and n = 5			
		$n_{\text{tot}} = 140$			$n_{\text{tot}} = 140$			$n_{\text{tot}} = 100$			
	Wald test (uncorrected)	83.4	100	100	86.8	100	100	77.8	100	100	
	Wald test (corrected)	69.0	100	100	78.0	100	100	58.8	100	100	
	Wilcoxon test	7.0	23.0	50.4	6.8	30.4	64.6	7.0	23.0	50.4	
Large sample size	Design*	N = 30 and n = 7			N = 42 and n = 5			N = 30 and n = 5			
		$n_{\text{tot}} = 210$			$n_{\text{tot}} = 210$			$n_{\text{tot}} = 150$			
	Wald test (uncorrected)	94.0	100	100	86.8	100	100	89.4	100	100	
	Wald test (corrected)	89.2	100	100	82.6	100	100	82.6	100	100	
	Wilcoxon test	7.4	31.0	67.0	9.2	43.8	85.0	7.4	31.0	67.0	

* N: number of patients per group of treatment; n: number of viral load measurements per patient; n_{tot}: total numbers of observations per group of treatment.

Discussion

The goal of this study was to evaluate the capacity of NLMEM to provide precise and accurate estimates of viral kinetic parameters when only sparse data with a large proportion of BLD data are available. In particular we aimed to evaluate the ability of this approach to correctly reject or not the null hypothesis of equal treatment effectiveness when two groups with different antiviral strategies are compared.

Our results showed that NLMEM provide very precise and accurate estimates for both the fixed effects and the inter-individual variance parameters, even when only 5 data points (at days 0, 2, 3, 7 and 14) were available within each patient. This allowed circumventing the need for intensive VL sampling measurements at treatment initiation, which are difficult to obtain in current clinical practice. Of note the viral clearance rate, c and its associated variability ω_c , were poorly estimated in this sparse initial sampling. However this parameter is mostly involved in the initial rate of viral decline and thus a poor estimation of c did not substantially deteriorate the estimation of the other parameters (Table 2).

By comparing the results obtained with and without a LOD for VL, we demonstrated that maximum likelihood appropriately handle BLD, consistent with results found previously [10]. The conclusion was somewhat different when considering the outcome of Wald test for comparing antiviral effectiveness. In this case the lack of information due to BLD contributed to an inflation of the type I error as compared to the results obtained with no LOD of VL, suggesting that the development of real-time PCR assays with lower LOD may improve the estimation of viral kinetic parameters. Interestingly, even when there was no LOD of VL, we still found that the type I error was inflated when the number of observations n_{tot} was lower than 140. This suggests that the outcome of Wald test should be taken with caution when the number of patients is low and in that case we suggested to use a threshold correction for the Wald test to limit the impact of this inflation. Here we used an empirical threshold correction but other corrections exist such as the Galland correction or the permutation test [15]. On the other hand the power of the Wald test (corrected or not) was found to be very high, especially when compared with that obtained using a Wilcoxon test on the mean viral decline at day 14. This result clearly shows the benefit of viral kinetic analyzed with NLMEM over empirical approaches done in most clinical studies. Although better results may be obtained by comparing the viral decline at earlier time points (such as day 2 or 7) the power of the Wilcoxon test remained lower than those achieved by modeling approach (not shown). Consistent with results found elsewhere, the power increases when the number of observations per patient increases and was much less sensitive to the number

of measurements within each patient [26]. From a clinical standpoint this finding indicates that the enrollment of a large population of study is to be preferred to small population sample with frequent assessments of VL.

We focused here on the properties of the Wald test and further studies would be needed to study how these results apply to other tests that require more computation time, such as likelihood ratio tests (LRT) or score test. Interestingly previous simulation studies using the SAEM algorithm in MONOLIX showed that the outcomes of these tests were largely comparable [15]. Of note this result may not hold when other estimation methods are used and for instance the outcomes of Wald test and LRT were found to be different when using the FOCE-I algorithm in NONMEM version 7 [15]. Indeed the Wald test had a lower power than LRT with FOCE-I, which was probably due to the poor estimation of the standard error of the covariate effect [25]. The advantage of the Wald test is that results are immediately obtained and do not require to compute the likelihood or its derivatives, as done for the LRT and the score test. Computation time needed by simulations could be largely reduced by using information theory and approximations to derive Fisher information matrix. For instance the software PFIM uses a first order approximation of the likelihood and, under this approximation, an analytical form of the Fisher matrix can be obtained [27]. Thus the expected variance of viral kinetic parameters could be obtained without the intensive simulations done here. Although such approximations worked well even with limited number of patients [11], it does not take into account BLD data and hence could underestimate the standard error when a large proportion of data are BLD. It should be noted that optimal design theory predicts that an increase of variances in random effect may deteriorate the precision of parameter estimates and the power of the Wald test. However this possibility was not investigated in this study where the inter-individual variance parameters were fixed.

Here we focused on the comparison of treatment antiviral effectiveness in the first two weeks of treatment. On this short time scale the standard biphasic model of viral kinetics has been shown to provide a good fit to the data [7,16]. However more complex models may be needed to fit long-term VL data, such as models that relax the assumption of constant target cells and/or account for the emergence of treatment resistant viruses [28,29]. Moreover viral decline during PI therapy is faster than what is observed with IFN-based therapy [30]. This feature is captured in the standard biphasic model by assuming that PIs lead to an enhancement of the treatment effectiveness, ε , and of the clearance rate of infected cells, δ [7,29,31]. Consistent with this observation we set here large mean values for both ε and δ , equal to 0.999 and 0.58 day^{-1} as

compared to 0.92 and 0.14 day⁻¹ with IFN-based therapy, respectively [30]. However this dual mode of action of PIs may be integrated in a more physiological way by using new multiscale viral kinetic models that explicitly integrate the effect of PIs on the intra-cellular viral dynamics [9].

Although the use of NLMEM has been shown to provide very precise and accurate estimates of the parameters even in presence of sparse designs, it should be acknowledged that these estimates are done on the population parameters, *i.e.*, the mean and the variance of parameters in the population. How NLMEM also allow precise and accurate estimation of the individual parameters for individualized treatment duration remains to be evaluated.

Conclusion

Compared with standard approach (with Wilcoxon test), modeling approach (with Wald test) provides very precise and accurate estimates of viral kinetic parameters and a more powerful tool to detect a difference in early viral kinetic profile of two PIs with different antiviral efficacy, even with sparse initial sampling or small number of patients. When designing a viral kinetic study, our results indicate that the enrollment of a larger number of patients is to be preferred to smaller sample size with more frequent assessments of viral load. We showed that a threshold correction is needed for the Wald test with small samples especially if there are many BLD data.

Competing interests

All authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

CL, JG and FM designed the simulation study and the MODCUPIC trial. CL carried out the simulations and drafted the manuscript. JG participated to the work of estimation (with CL). CL, JG and FM participated in the statistical analysis and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors thank IFR02 and Hervé Le Nagard for the use of the Centre de Biomodélisation.

Received: 26 December 2012 Accepted: 12 April 2013

Published: 25 April 2013

References

1. Lavanchy D: Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clin Microbiol Infect* 2011, **17**:107–115.
2. Shepard CW, Finelli L, Alter MJ: Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* 2005, **5**:558–567.
3. European Association for the Study of the Liver: EASL Clinical Practice Guidelines: management of hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2011, **55**(2):245–264.
4. McHutchison JG, Everson GT, Gordon SC, Jacobson IM, Sulkowski M, Kauffman R, McNair L, Alam J, Muir AJ: Telaprevir with peginterferon and ribavirin for chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 2009, **360**:1827–1838.
5. Poordad F, McCone J Jr, Bacon BR, Bruno S, Manns MP, Sulkowski MS, Jacobson IM, Reddy KR, Goodman ZD, Boparai N, DiNubile MJ, Snikieniene V, Brass CA, Albrecht JK, Brownicki J-P: Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 2011, **364**:1195–1206.
6. Guidance for industry: Chronic hepatitis C virus infection: developing direct-acting antiviral agents for treatment. Rockville, MD: Food and Drug Administration; September 2010 (draft). <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM225333.pdf>.
7. Guedj J, Perelson AS: Second-phase hepatitis C virus RNA decline during telaprevir-based therapy increases with drug effectiveness: implications for treatment duration. *Hepatology* 2011, **53**:1801–1808.
8. Lenz O, de Bruijne J, Vijgen L, Verbinen T, Weegink C, Van Marck H, Vandenbroucke I, Peeters M, Simmen K, Fanning G, Verloes R, Picchio G, Reesink H: Efficacy of re-treatment with TMC435 as combination therapy in hepatitis C virus-infected patients following TMC435 monotherapy. *Gastroenterology* 2012, **143**:1176–1178. e1–6.
9. Guedj J, Dahari H, Rong L, Sansone ND, Nettles RE, Cotler SJ, Layden TJ, Uprichard SL, Perelson AS: Modeling shows that the NS5A inhibitor daclatasvir has two modes of action and yields a shorter estimate of the hepatitis C virus half-life. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, **110**(10):3991–3996.
10. Thiébaud R, Guedj J, Jacqmin-Gadda H, Chêne G, Trimoulet P, Neau D, Commenges D: Estimation of dynamical model parameters taking into account undetectable marker values. *BMC Med Res Methodol* 2006, **6**:38.
11. Guedj J, Bazzoli C, Neumann AU, Mentré F: Design evaluation and optimization for models of hepatitis C viral dynamics. *Stat Med* 2011, **30**:1045–1056.
12. Wu H, Ding AA, De Gruttola V: Estimation of HIV dynamic parameters. *Stat Med* 1998, **17**:2463–2485.
13. Hing JP, Woolfrey SG, Greenslade D, Wright PM: Analysis of toxicokinetic data using NONMEM: impact of quantification limit and replacement strategies for censored data. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 2001, **28**:465–479.
14. Duval V, Karlsson MO: Impact of omission or replacement of data below the limit of quantification on parameter estimates in a two-compartment model. *Pharm Res* 2002, **19**:1835–1840.
15. Bertrand J, Comets E, Chenel M, Mentré F: Some alternatives to asymptotic tests for the analysis of pharmacogenetic data using nonlinear mixed effects models. *Biometrics* 2012, **68**:146–155.
16. Neumann AU, Lam NP, Dahari H, Gretch DR, Wiley TE, Layden TJ, Perelson AS: Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science* 1998, **282**:103–107.
17. Guedj J, Dahari H, Shudo E, Smith P, Perelson AS: Hepatitis C viral kinetics with the nucleoside polymerase inhibitor mericitabine (RG7128). *Hepatology* 2012, **55**:1030–1037.
18. Guedj J, Dahari H, Pohl RT, Ferenci P, Perelson AS: Understanding silibinin's modes of action against HCV using viral kinetic modeling. *J Hepatol* 2012, **56**:1019–1024.
19. Shudo E, Ribeiro RM, Talal AH, Perelson AS: A hepatitis C viral kinetic model that allows for time-varying drug effectiveness. *Antivir Ther* 2008, **13**:919–926.
20. Matsuura K, Tanaka Y, Hasegawa I, Ohno T, Tokuda H, Kurbanov F, Sugauchi F, Nojiri S, Joh T, Mizokami M: Abbott RealTime hepatitis C virus (HCV) and Roche Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HCV assays for prediction of sustained virological response to pegylated interferon and ribavirin in chronic hepatitis C patients. *J Clin Microbiol* 2009, **47**:385–389.
21. Kuhn E, Lavielle M: Maximum likelihood estimation in nonlinear mixed effects models. *Comput Stat Data Anal* 2005, **49**:1020–1038.
22. Beal SL: Ways to fit a PK model with some data below the quantification limit. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 2001, **28**:481–504.
23. Samson A, Lavielle M, Mentré F: Extension of the SAEM algorithm to left censored data in nonlinear mixed-effects model: application to HIV dynamics model. *Comput Statist Data Anal* 2006, **51**:1562–1574.
24. Dubois A, Lavielle M, Gsteiger S, Pigeolet E, Mentré F: Model-based analyses of bioequivalence crossover trials using the stochastic approximation expectation maximisation algorithm. *Stat Med* 2011, **30**:2582–2600.
25. Bertrand J, Comets E, Laffont CM, Chenel M, Mentré F: Pharmacogenetics and population pharmacokinetics: impact of the design on three tests using the SAEM algorithm. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 2009, **36**:317–339.
26. Retout S, Comets E, Samson A, Mentré F: Design in nonlinear mixed effects models: optimization using the Fedorov-Wynn algorithm and power of the Wald test for binary covariates. *Stat Med* 2007, **26**:5162–5179.
27. Retout S, Mentré F: Optimization of individual and population designs using Splus. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 2003, **30**:417–443.
28. Snoeck E, Chanu P, Lavielle M, Jacqmin P, Jonsson EN, Jorga K, Goggin T, Grippo J, Jumble NL, Frey N: A comprehensive hepatitis C viral kinetic model explaining cure. *Clin Pharmacol Ther* 2010, **87**:706–713.

29. Rong L, Dahari H, Ribeiro RM, Perelson AS: **Rapid emergence of protease inhibitor resistance in hepatitis C virus.** *Sci Transl Med* 2010, **2**:30ra32.
30. Chatterjee A, Guedj J, Perelson AS: **Mathematical modelling of HCV infection: what can it teach us in the era of direct-acting antiviral agents?** *Antivir Ther* 2012, **17**:1171–1182.
31. Adiwijaya BS, Hare B, Caron PR, Randle JC, Neumann AU, Reesink HW, Zeuzem S, Herrmann E: **Rapid decrease of wild-type hepatitis C virus on telaprevir treatment.** *Antivir Ther* 2009, **14**:591–595.

doi:10.1186/1471-2288-13-60

Cite this article as: Laouénan *et al.*: Clinical trial simulation to evaluate power to compare the antiviral effectiveness of two hepatitis C protease inhibitors using nonlinear mixed effect models: a viral kinetic approach. *BMC Medical Research Methodology* 2013 **13**:60.

**Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



3. Analyse par modélisation des relations concentrations, cinétique virale et tolérance des trithérapies

3.1. L'essai clinique MODCUPIC

Dans le cadre de cette thèse, nous avons écrit le protocole et mené une étude ancillaire de la cohorte ANRS CO20 CUPIC, l'étude MODCUPIC « *Modélisation de la cinétique virale initiale des patients porteurs chroniques du VHC traités par une nouvelle association d'antirétroviraux comprenant interféron pégylé (Peg-IFN- α)/ribavirine et telaprevir ou boceprevir* » (investigateur principal : Pr P Marcellin - hôpital Beaujon, Clichy; centre de méthodologie et de gestion : Dr C Laouénan, Pr F Mentré - INSERM, IAME, UMR 1137, Université Paris Diderot, Paris).

Les objectifs de MODCUPIC étaient d'étudier les relations entre les concentrations plasmatiques des trois molécules (Peg-IFN- α , ribavirine et un inhibiteur de protéase (IP) de 1^{ère} génération : telaprevir ou boceprevir) et, d'une part la cinétique virale initiale et, d'autre part la tolérance avec une approche par MNLEM chez des patients ayant une hépatite chronique C de génotype 1 avec une cirrhose compensée et non répondeurs à une bithérapie antérieure.

Cette étude consistait à mesurer plus fréquemment la charge virale et les concentrations des médicaments dans les 12 semaines suivant l'initiation de l'IP. Du fait de la différence des schémas thérapeutiques entre les deux IP, deux groupes de patients ont été constitués de manière non randomisées :

- un groupe « telaprevir » recevant : telaprevir (750 mg toutes les 8 heures, *per os*) + Peg-IFN- α 2a (1,5 μ g/kilo/semaine, sous cutanée) + ribavirine (en fonction du poids de 1000 à 1200 mg/jour répartis en 2 prises par jour, *per os*) pendant 12 semaines puis la bithérapie seule pendant 36 semaines ;
- un groupe « boceprevir » recevant : Peg-IFN- α 2b (180 μ g/semaine, sous cutanée) + ribavirine (en fonction du poids de 1000 à 1200 mg/jour répartis en 2 prises par jour, *per os*) en bithérapie pendant 4 semaines (phase de lead-in). Puis adjonction du boceprevir (800 mg toutes les 8 heures, *per os*) jusqu'à 48 semaines.

Le planning des prélèvements spécifiques de MODCUPIC dans les deux groupes était différent du fait de la phase de lead-in (Figure 8) :

- 10 prélèvements pour le groupe telaprevir : J0 (début de la trithérapie), J0 + 8 heures, J1, J2, J3, S1, S2, S3, S4 et S12 ;
- 12 prélèvements pour le groupe boceprevir : J0 (début de la bithérapie), S2, S4 (début du boceprevir), S4 + 8 heures, S4 + 1 jour, S4 + 2 jours, S4 + 3 jours, S5, S6, S7, S8 et S16.

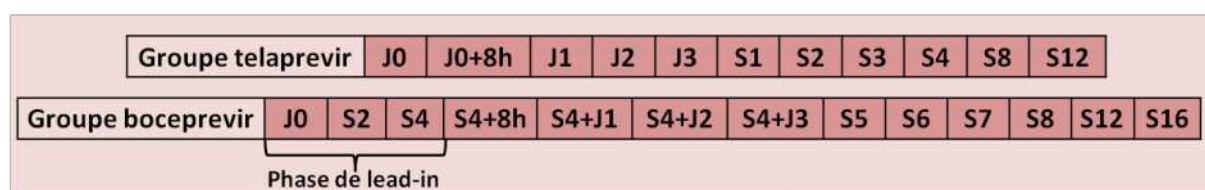


Figure 8 : planning des prélèvements de l'étude ANRS MODCUPIC.

A chaque temps, la charge virale et les concentrations des 3 molécules ont été mesurées à partir d'un prélèvement recueilli le matin avant la prise de l'IP et de la ribavirine (concentrations résiduelles). Les données sur l'adhérence et les horaires exactes de prise n'étaient pas recueillies dans cette étude. Ensuite, les patients étaient suivis selon le protocole de l'étude principale jusqu'à 6 mois après l'arrêt du traitement pour évaluer la RVS.

Les mesures de concentrations de la ribavirine et des deux IP ont été effectuées dans le service de pharmacie de l'hôpital Bichat, AP-HP, Paris (Dr. G Peytavin) et celles du Peg-IFN- α dans le laboratoire de virologie de l'hôpital Purpan, Toulouse (Dr. F Nicot). Les mesures de charges virales ont été effectuées dans l'unité Inserm UMR 773-CRB3, Université Paris Diderot, Clichy (M Lapalus).

Quinze patients ont été inclus (9 patients traités par telaprevir et 6 par boceprevir) entre juin 2011 et avril 2012 dans quatre centres.

3.2. Modélisation du lien entre concentrations et cinétique virale des trithérapies

3.2.1. Résumé

A partir des données recueillies chez les 15 patients inclus dans l'essai MODCUPIC, nous proposons la première description précise des relations entre les concentrations des trithérapies (Peg-IFN- α , ribavirine et un IP : telaprevir ou boceprevir) et la cinétique virale du VHC en condition réelle d'utilisation chez des patients atteints d'hépatite chronique C à un stade avancée de la maladie par un modèle PK/VK.

Pour le Peg-IFN- α et la ribavirine, les concentrations résiduelles, $C(t)$, ont été modélisées avec un modèle exponentiel reflétant l'augmentation progressive observée des concentrations au cours du temps :

$$C(t) = C_{ss} \times (1 - e^{-kt})$$

où C_{ss} est la concentration résiduelle à l'équilibre et k le taux constant d'élimination.

Les deux IP ont une demi-vie courte et donc nous n'observons pas d'augmentation progressive des concentrations au cours du temps. Les concentrations résiduelles, $C(t)$, ont donc été modélisées avec un modèle constant :

$$C(t) = C_{ss}$$

Pour l'analyse de la cinétique virale, nous avons considéré le même modèle standard que précédemment (décrit dans la partie 1.5.3). Il s'agissait ici d'un modèle de cinétique virale initiale où l'on s'intéressait uniquement aux virus sensibles et donc les rebonds virologiques qui interviennent chez 3 patients ont été censurés. Nous avons fait la même hypothèse que précédemment (article *BMC Medical Research Methodology*) sur le nombre constant de cellules cibles (T). Pour étudier les relations entre les concentrations résiduelles à l'équilibre et l'efficacité antivirale de chaque molécule le modèle E_{max} a été utilisé (décrit dans la partie 1.6). Les paramètres de ce modèle PK/VK (V_0 , c , δ , EC_{50}) ont été estimés par MNLEM à l'aide de l'algorithme SAEM implémenté dans le logiciel MONOLIX. Nos précédents travaux ayant mis en évidence une inflation de l'erreur de type I du test de Wald, nous avons utilisé l'approche par permutation pour déterminer les p-values des comparaisons des paramètres du modèle PK/VK entre les deux groupes de traitement. Les relations entre ces paramètres et la RVS ont également été étudiées.

Les résultats de cette analyse ont permis pour la première fois de mettre en évidence une association significative entre l'exposition aux IP et l'efficacité antivirale. Les deux IP avaient un niveau comparable de concentrations molaires. La EC_{50} du telaprevir était significativement différent du boceprevir, se traduisant par une efficacité antivirale significativement plus élevée du telaprevir par rapport au boceprevir ($\varepsilon=99.8\%$ vs 99.0% , respectivement, $P=0.002$). L'efficacité antivirale du Peg-IFN- α était modeste et la ribavirine n'avait pas de contribution significative sur l'efficacité antivirale globale. Pour les deux trithérapies, les paramètres moyens de cinétique virale (notamment le paramètre δ qui est le reflet de la seconde phase du déclin viral) étaient plus faible que ceux observés chez des patients non cirrhotiques, ce qui se traduit par une moindre décroissance de la charge virale dans cette population de patients cirrhotiques et non-répondeurs. De plus, cette seconde phase était significativement plus élevée chez les patients ayant une RVS.

L'ensemble de ce travail a fait l'objet d'une publication en 2014 dans le journal *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.

3.2.2. Article 2 : *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*

Using pharmacokinetic and viral kinetic modeling to estimate the antiviral effectiveness of telaprevir, boceprevir and Peg-IFN during triple therapy in treatment-experienced HCV infected cirrhotic patients (ANRS CO20-CUPIC)

Cédric Laouénan,^{a,b}# Patrick Marcellin,^{c,d} Martine Lapalus,^c Feryel Khelifa-Mouri,^d Nathalie Boyer,^d Fabien Zoulim,^{e,f} Lawrence Serfaty,^g Jean-Pierre Bronowicki,^{h,i} Michelle Martinot-Peignoux,^c Olivier Lada,^c Tarik Asselah,^{c,d} Céline Dorival,^j Christophe Hézode,^{k,l} Fabrice Carrat,^{j,m} Florence Nicot,ⁿ Gilles Peytavin,^{a,o} France Mentré,^{a,b} Jeremie Guedj^a.

INSERM, IAME, UMR 1137, Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France^a; AP-HP, Hôpital Bichat, Department of Biostatistic, Paris, France^b; INSERM, CRI Paris Montmartre, UMR 1149, Univ Paris Diderot, Clichy, France^c; AP-HP, Hôpital Beaujon, Hepatology, Physiopathology and Treatment of Viral Hepatitis, Clichy, France^d; INSERM, UMR 1052, Univ Lyon, Lyon, France^e; Hospices Civils de Lyon, Department of Hepatology, Lyon, France^f; AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Department of Hepatology, Paris, France^g; INSERM, UMR 954, Univ Lorraine, Vandoeuvre-les-Nancy, France^h; Centre Hospitalier Universitaire de Nancy, Department of Hepatology, Vandoeuvre-les-Nancy, Franceⁱ; INSERM, UMR 1136, Univ Pierre et Marie Curie, Paris, France^j; INSERM, UMR 955, Univ Paris-Est, Créteil, France^k; AP-HP, Hôpital Henri Mondor, Department of Hepatology, Créteil, France^l; AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Department of public health, Paris, France^m; CHU Toulouse, IFB Purpan, Virology, laboratory, Toulouse, Franceⁿ; AP-HP, Hôpital Bichat, Department of Clinical Pharmacokinetics, Paris, France^o.

Running Head: Effectiveness of triple therapy in cirrhotic patients

Address correspondence to Cédric Laouénan, cedric.laouenan@inserm.fr

Word count:

- Abstract: 243

- Article: 4685

Abstract

Background Triple therapy combining a protease inhibitor (PI) telaprevir or boceprevir, pegylated-interferon (Peg-IFN) and ribavirin (RBV) have dramatically increased the chance to eradicate hepatitis C virus (HCV). However the efficacy of this treatment remains suboptimal in cirrhotic experienced-patients. Here we aimed to better understand the origin of this impaired response by estimating the antiviral effectiveness of each drug.

Methods Fifteen genotype 1-patients with compensated cirrhosis, non-responders to a prior Peg-IFN/RBV therapy were enrolled in a non-randomized study. HCV-RNA and drug concentrations of PIs, Peg-IFN and RBV were frequently assessed in the first 12 weeks of treatment and were analyzed using a pharmacokinetics/viral kinetics model.

Results Both PIs achieved similar level of molar concentrations ($P=0.5$), but there was a significant difference of EC_{50} ($P=0.008$), leading to a larger antiviral effectiveness than boceprevir in blocking viral production (99.8% vs 99.0%, respectively, $P=0.002$). In all patients the antiviral effectiveness of Peg-IFN was modest (43.4%) and there was no significant contribution of RBV exposure on the total antiviral effectiveness. The second phase of viral decline, which is attributed to the loss rate of infected cells, was slow (0.19 day^{-1}) and was higher in patients that subsequently eradicated HCV ($P=0.03$).

Conclusion Both PIs achieved a high level of antiviral effectiveness. However the suboptimal antiviral effectiveness of Peg-IFN/RBV and the low loss of infected cells suggest that longer treatment duration might be needed in cirrhotic treatment experienced-patients and that future IFN-free regimen may be particularly beneficial to these patients.

Keywords: Hepatitis C virus; Non-linear mixed effect models; Early viral kinetics; Protease inhibitor; Pegylated-interferon; Ribavirin; Mathematical modeling; Pharmacokinetic

Introduction

Chronic infection with hepatitis C virus (HCV) affects approximately 160 million people worldwide ¹ and is the leading cause of cirrhosis, liver cancer and liver transplantation ². The goal of treatment is to achieve a sustained virological response (SVR), marker of viral eradication, assessed by the absence of detectable HCV RNA six months after treatment discontinuation. The approval in 2011 of two protease inhibitors (PI), telaprevir and boceprevir, in combination with pegylated-interferon-alpha and ribavirin (Peg-IFN/RBV) ³, has marked an important milestone with SVR rates higher than 70% in HCV genotype 1 infected patients ^{4,5}. Recently two new triple therapy involving sofosbuvir, a nucleoside polymerase inhibitor, and simeprevir, a new protease inhibitor, have been approved by the European and American regulatory agencies, showing in clinical trials even higher SVR rates of 90% ⁶. However the cost of these new treatments, about twice as much as telaprevir or boceprevir-based therapy ⁷, will make them out of reach for many countries. Therefore triple therapy with Peg-IFN, RBV and telaprevir/boceprevir will continue to be vastly used in the next years and will remain the only therapeutic option for many patients.

Although these results suggest that a functional cure might be obtained in a large majority of patients, one should keep in mind that issues remain. In particular the proportion of patients with advanced liver disease and cirrhosis and/or who had failed a previous treatment with Peg-IFN/RBV is under represented in the patient population in clinical trials ⁸⁻¹¹. The evaluation of the triple therapy efficacy in this population was precisely the goal of the ANRS-CO20-CUPIC cohort (Compassionate Use of Protease Inhibitors in viral C Cirrhosis; ClinicalTrials.gov number: NCT01514890) ¹², where 511 genotype 1 treatment-experienced cirrhotic patients were included. In this study the SVR rates 12 weeks after treatment discontinuation (SVR12) were equal to 52% and 43% in telaprevir and boceprevir treated patients, respectively ¹³. The origin of this impaired response might encompass a variety of factors, in particular impaired drug pharmacokinetics (PK) or limited sensitivity to PI agents and/or Peg-IFN/RBV in this particular population.

One way to evaluate treatment antiviral effectiveness and to optimize therapy is to use PK-viral kinetic (VK) models that provide a useful tool to quantitatively describe the relationship between drug exposure and viral response (reviewed in ¹⁴). However no such analysis has been published with boceprevir and results published for telaprevir were mostly based on treatment naive and/or non-cirrhotic patients ¹⁵⁻¹⁷.

Here, we aimed to get new insights into the determinants of the response to triple therapy by analyzing in details, within a subset of 15 patients enrolled in the ANRS-CO20-CUPIC study, the relationship between drug concentrations and early virological response. We used the techniques of PK-VK modeling in order to tease out the relative antiviral effectiveness of each of the agents involved in the triple therapy (*i.e.*, boceprevir or

telaprevir, Peg-IFN and RBV) and to investigate for a possible association with long term virological response.

Materials and methods

Patients and data

MODCUPIC is a substudy of the French multicentre prospective ANRS-CO20-CUPIC cohort. In four centres, from September 2011 to September 2012, patients chronically monoinfected with HCV genotype 1, compensated cirrhosis (Child-Pugh class A), non-responders to a prior IFN-based therapy and who started triple therapy were recruited. The diagnosis of cirrhosis was made by liver biopsy or non-invasive tests, Fibrotest® or Fibroscan® or Fibrometer® or Hepascore® at the discretion of the investigator, according to the French recommendations¹⁸. The choice between TVR- or BOC-based therapies was at the investigator's discretion without randomization. TVR-based therapy included 12 weeks of telaprevir (750 mg/8 hours) in combination with Peg-IFN- α 2a (180 μ g/week) and RBV (1,000 or 1,200 mg/day, depending on body weight) then 36 weeks of Peg-IFN- α 2a/RBV (named group telaprevir in the following). BOC-based therapy included 4 weeks (lead-in phase) of Peg-IFN- α 2b (1.5 μ g/kg/week) or Peg-IFN- α 2a (180 μ g/week) and RBV (800 or 1,400 mg/day, depending on body weight) then 44 weeks of Peg-IFN- α 2b/RBV and boceprevir (800 mg/8 hours) (named group boceprevir in the following). Patients were followed up to six months after treatment discontinuation to assess SVR.

Written informed consent was obtained before enrolment. The protocol was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the "Ile-de-France IX Ethics Committee" (Créteil, France).

Bioanalytical methods

HCV RNA and drug concentrations were measured post PIs initiation at hours 0, 8, days 1, 2, 3 and weeks 1, 2, 3, 4, 8 and 12. Patients treated with boceprevir had two additional VL and concentrations measurements during the lead-in phase. Blood samples were collected early in the morning before the first daily dose of PIs and RBV and therefore only trough pre-dose drug concentrations were collected. All samples were collected on SST (serum) vacutainers, kept at 4°C until centrifuged at 3,000 RPM for 10 minutes in a 4°C centrifuge, within 1 hour after collection, aliquoted and kept at -80°C until analysis.

PIs concentrations in serum were determined using ultra-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry with a lower limit of quantification (LOQ) of 5 ng/ml and 10 ng/ml for boceprevir and telaprevir, respectively¹⁹.

PI concentrations were converted to μ mol/l for analysis using molar masses of 519.68 g/mol and 679.85 g/mol for boceprevir and telaprevir, respectively. RBV concentrations in

serum were determined using ultra-performance liquid chromatography coupled with UV detection with a LOQ of 100 ng/ml²⁰. Peg-IFN- α 2a and - α 2b in serum were determined with a bioassay which was chosen because the objective was to quantify the antiviral activity of Peg-IFN- α and not only the concentration. Immunoassay measures the physical quantity of material but does not differentiate between active and inactive molecules while bioassay for IFN- α is based on the protection of cultured cells against the cytopathic effect of a challenge virus and also was suitable for assaying both Peg-IFN- α 2a and Peg-IFN- α 2b. The reference solutions contained 2.8–180 ng/ml of Peg-IFN- α 2a (Roche Diagnostics, Germany)²¹.

HCV-RNA levels were measured with a real-time PCR-based assay, Cobas® Ampliprep/Cobas TaqMan® assay (Roche Diagnostics, Germany), with a lower limit of detection (LOD) of 15 IU/ml. DNA samples were genotyped for the IL28B rs12979860 polymorphism (AmpliTaq gold® DNA polymerase and BigDye® terminator cycle sequencing kit, Applied Biosystems, UK).

Drug pharmacokinetic modeling

All drug concentrations were fitted separately in telaprevir and boceprevir treatment groups. For both Peg-IFN and RBV, the trough serum concentrations, noted $C^{Peg-IFN}(t)$ and $C^{RBV}(t)$, respectively were fitted using an exponential model to reflect the progressive increase in trough drug concentrations over time:

$$C^{Peg-IFN}(t) = C_{ss}^{Peg-IFN} \times (1 - e^{-kt}) \quad \text{Eq. (1)}$$

$$C^{RBV}(t) = C_{ss}^{RBV} \times (1 - e^{-kt}) \quad \text{Eq. (2)}$$

where C_{ss} is the trough concentration at steady state and k the rate constant of elimination which reflects the progressive increase in $C(t)$ over time.

For both PI drugs, consistent with the fact that they have a short elimination half-life²², no significant increase of trough concentrations over time was observed. Therefore concentrations for both telaprevir and boceprevir were fitted using a constant model:

$$C^{PI}(t) = C_{ss}^{PI} \quad \text{Eq. (3)}$$

Viral kinetic modeling

The following model of HCV viral kinetics (VK) was used to fit the changes in HCV RNA²³:

$$\begin{aligned} \frac{dI}{dt} &= bVT - \delta I \\ \frac{dV}{dt} &= p(1 - \varepsilon(t))I - cV \end{aligned} \quad \text{Eq. (4)}$$

where T represent the target cells that can be infected by virus, V , with rate b . Infected cells, I , are lost with rate δ and produce p virions per day, which are cleared from serum with rate c . The target cell level is assumed constant throughout the study period (12 weeks) and remains at its pre-treatment value $T_0 = c\delta/p\beta$. Treatment is assumed to reduce the average

rate of viral production per cell from p to $p(1-\varepsilon)$, where ε represents the drug antiviral effectivenesses, *i.e.*, $\varepsilon = 0.99$ implying the drug is 99% effective in blocking viral production. This model predicts that VL will fall in a biphasic manner, with a rapid first phase lasting for a couple of days that reduce the VL with a magnitude equal to $\log_{10}(1-\varepsilon)$, followed by a second slower but persistent second phase of viral decline with rate $\varepsilon\delta$. Therefore a difference between $\varepsilon = 99.9\%$ and $\varepsilon = 99.0\%$ corresponds to a 10-fold difference in the viral production under treatment and will lead to 1-log difference between the two curves of viral decline²⁴. We fixed p and b to 100 IU/ml/cell/day and 10^{-7} (IU/ml)⁻¹/day, respectively, without loss of generality²⁵.

The effectiveness of each drug in blocking viral production was described by an E_{\max} model assuming a maximum inhibition of 100%:

$$\varepsilon^{PI}(t) = \frac{C^{PI}(t)}{C^{PI}(t) + EC_{50}^{PI}}$$

$$\varepsilon^{Peg-IFN}(t) = \frac{C^{Peg-IFN}(t)}{C^{Peg-IFN}(t) + EC_{50}^{Peg-IFN}} \quad \text{Eq. (5)}$$

where EC_{50}^{PI} (respectively $EC_{50}^{Peg-IFN}$) is the PI (resp. Peg-IFN) concentration at which the PI (resp. Peg-IFN) is 50% effective, and $C^{PI}(t)$ (resp. $C^{Peg-IFN}(t)$) are the individual predictions (see below) given by the PK models (Eq. 1 and 3).

The combined effect of PIs and Peg-IFN was modeled using a Bliss independent action model²⁶ and the total efficacy $\varepsilon(t)$ was given by:

$$(1 - \varepsilon(t)) = (1 - \varepsilon^{PI}(t))(1 - \varepsilon^{Peg-IFN}(t)) \quad \text{Eq. (6)}$$

Since the effect of RBV on the early virological response is expected to be modest²⁷⁻²⁹ we did not incorporate the effect of RBV into the reference model (Eq. 4-6). In a second step we tested whether the effectiveness of RBV, also modeled using an E_{\max} model could enhance the effect in blocking viral production or reduce viral infectivity, as suggested previously³⁰.

Data analysis and parameter estimation

The pharmacokinetics/viral kinetics (PK-VK) model given by Eq. 4-6 can be used only to characterize the viral kinetics of drug sensitive virus and therefore cannot fit viral rebounds due to the emergence of drug-resistant virus. Therefore only HCV RNA data until virologic rebounds (with no indication of lack of compliance) were used to estimate the viral kinetic parameters.

Parameters V_0 , c , δ , EC_{50}^{PI} and $EC_{50}^{Peg-IFN}$ were estimated using non-linear mixed-effect models (NLMEM). In this approach, each individual parameter θ_i is comprised of a fixed part θ , which represents the mean value of the parameter in the population (fixed effects), and a random part η_i chosen from a Gaussian distribution with mean 0 and standard deviation ω_i that accounts for the inter-individual variability. Therefore, for all parameters $\theta_i = \theta e^{\eta_i}$

where $\eta_i \sim N(0, \omega^2)$. Both PK data and $\text{Log}_{10}(\text{HCV RNA})$ were best described using an additive residual error with constant variance.

Model parameters were estimated using the Stochastic Approximation Expectation Minimization (SAEM) algorithm in MONOLIX v4.2 (available at <http://www.lixoft.eu>). Of note this approach is based on maximum likelihood estimation which take into account the information brought by data under the LOD as left-censored data^{31,32}.

Model selection was done using the Bayesian information criteria (BIC), a fitting criterion derived for each model from the computation of likelihood that takes into account the number of estimated parameters used (the lower the better³³). Model evaluation was performed using goodness-of-fit plots, as well as the individual weighted residuals (IWRES) and the normalized prediction distribution errors (NPDE) over time.

Difference in PK-VK model parameters between telaprevir and boceprevir treatment group

A Wald test on the PK-VK model parameters (c, δ, EC_{50}^{PI}) was used to assess the difference in population parameters between the two groups. Because we previously showed that this approach could lead to an inflation of the type I error in case of small sample size (N<20 per group)³⁴, a permutation test was performed to confirm statistical significance when the Wald test was significant at the level of 5%. In brief, 1,000 datasets were simulated by randomly allocating patients to telaprevir or boceprevir group, maintaining a similar proportion of patients allocated to each groups than in the original dataset. Then the P-value of the Wald test was calculated for each simulated data set. Finally the corrected P-value of the permutation test is equal to the proportion of simulated datasets having a P-value lower than the one found one the original dataset.

Because the genetic barrier to resistance of PI (*i.e.*, the number of change in amino acids needed to generate mutants with high level of resistance) depends of HCV subgenotype and therefore lead to different SVR rate, we also estimated the effect of HCV subgenotype (1a vs non-1a) on viral kinetic parameters. IL28B polymorphism, which is associated with response to IFN-based therapy, was not investigated because these patients had failed to a previous bitherapy.

Prediction and comparison of individual parameters

Individual Empirical Bayesian Estimates (EBE) parameters for both PK and VK were obtained by computing for each patient the Maximum A Posteriori (MAP) estimate. The individual antiviral effectiveness at steady state, ε_{ss} , of each agent was defined by:

$$\varepsilon_{ss}^{PI} = \frac{C_{ss}^{PI}}{C_{ss}^{PI} + EC_{50}^{PI}}$$

$$\varepsilon_{ss}^{Peg-IFN} = \frac{C_{ss}^{Peg-IFN}}{C_{ss}^{Peg-IFN} + EC_{50}^{Peg-IFN}} \quad \text{Eq. (7)}$$

Non-parametric two-sided tests (Wilcoxon test) were used to compare i) individual EBE PK parameters between patients who received telaprevir *vs* boceprevir and between patients who received Peg-IFN- α 2a *vs* - α 2b, and ii) individual EBE PK parameters between SVR and non-SVR patients. Because all patients were non-responder to Peg-IFN, the effect of IL28B genotype on PK and VK parameters was not tested.

Results

Fifteen HCV genotype 1 patients were included 9 receiving telaprevir and 6 receiving boceprevir. Twelve (80%) were men, with a median [min; max] age of 55 [44; 64] years. Seven (47%) patients were infected with subgenotype 1a, 2 (22%) in telaprevir group and 5 (83%) in boceprevir group. Prior treatment responses were partial response, null response, relapse and early discontinuation for adverse events in 2, 5, 6 and 2 patients, respectively. Only two patients had the most favorable IL28B CC genotype³⁵. Main characteristics of the patients are presented in Table 1.

Two patients had a viral breakthrough (at weeks 3 and 8). Eleven patients received Peg-IFN- α 2a (8 in telaprevir group and 3 in boceprevir group), 3 patients Peg-IFN- α 2b (all in boceprevir group) and one patient in telaprevir group did not receive any injection of Peg-IFN (and this patient had a viral breakthrough at week 3).

Fig. 1 shows the observed drug concentrations versus time and Table 2 gives the estimated steady state trough concentrations, C_{ss} , for all drugs. There was no significant difference in the molar medians steady state concentrations of telaprevir and boceprevir ($C_{ss}^{telaprevir} = 3.77$ [2.68; 5.98] μ mol/l *i.e.* 2,563.0 ng/ml [1,822.0; 4,065.5] and $C_{ss}^{boceprevir} = 3.92$ [3.22; 7.64] μ mol/l *i.e.* 2037.1 ng/ml [1,673.4; 3,970.4], $P=0.5$). There was no significant difference in the median steady state concentrations of Peg-IFN- α 2a and - α 2b ($C_{ss}^{Peg-IFN-\alpha 2a} = 89.6$ [52.8; 110.4] ng/ml and $C_{ss}^{Peg-IFN-\alpha 2b} = 55.4$ [55.3; 57.9] ng/ml, $P=0.2$). The concentrations of RBV increased over time in all patients and could be well captured by our model (Eq. 2) with a median k equal to 0.10 day⁻¹, corresponding to a half-life of increase of about 7 days. At equilibrium medians C_{ss}^{RBV} were equal to 2,860 [2,428; 3,874] ng/ml.

After the PK parameters were estimated, the predicted individual PK time courses were plugged into the PK-VK model (see methods). Baseline VL was higher in the telaprevir group than in the boceprevir group, thus a treatment group effect was added on baseline VL ($V_0^{telaprevir} = 6.43 \log_{10}$ IU/ml *vs* $V_0^{boceprevir} = 5.52 \log_{10}$ IU/ml, $P=0.0001$). A greater proportion of patients that received boceprevir were genotype 1a relative to those that received telaprevir ($P=0.04$). Subgenotype is an important predictor of the response to treatment in particular with telaprevir with a lower genetic barrier to resistance with genotype 1a than 1b (only one nucleotide change in genotype 1a viral genomes is required to generate mutations V36M and R155K/T, *vs* two in genotype 1b)³⁶. This may explain why genotype 1a patients were

preferentially treated with boceprevir. We did not find any significant effect of subgenotype on any of the parameters.

The model could well describe the kinetics of HCV decline observed both during the lead-in phase (in the boceprevir group) and after the initiation of the PIs (in both groups, see Fig. 2). There was no evidence of model misspecification as showed by the goodness-of-fit plot (Fig. 3) and all parameters could be estimated with a good precision (Table 3).

The model predicted a mean $EC_{50}^{Peg-IFN}$ equal to 106 ng/ml, leading to a low antiviral effectiveness at steady state of Peg-IFN at steady state of 43.4% [0.0; 52.7], consistent with the modest 0.67 log₁₀ IU/ml drop observed during the four weeks lead-in phase in patients treated with boceprevir (Fig. 2).

After PI initiation, VL declines in a biphasic manner in all patients, where a rapid first phase was followed by a second slower phase. The rapid first phase was attributed to a clearance rate of virus, c , equal to 3.98 day⁻¹ and to a high level of antiviral effectivenesses for both PIs. The intrinsic potency of the two molecules, as measured by the EC_{50}^{PI} , was significantly higher for telaprevir than boceprevir ($EC_{50}^{telaprevir} = 0.009 \mu\text{mol/l}$ vs $EC_{50}^{boceprevir} = 0.04 \mu\text{mol/l}$, $P=0.008$). Importantly the statistical significance of this difference was obtained after taking into account the small sample size (see methods) and adjusted on baseline VL. Since telaprevir had a lower EC_{50} than boceprevir and that both drugs achieved similar levels of molar concentrations the model predicted that the median individual antiviral effectiveness of PI agent in blocking viral production was significantly higher in patients that received telaprevir than in those who received boceprevir ($\varepsilon_{ss}^{telaprevir} = 99.8\%$ [99.3; 99.9] and $\varepsilon_{ss}^{boceprevir} = 99.0\%$ [98.0; 99.6], $P=0.002$). Interestingly this model could well capture the relationship between the serum exposure and its antiviral effectiveness, demonstrating that the variability in drug exposure needs to be taken into account to understand the between-subject variability in PIs antiviral effectiveness (Fig. 4A). Lastly because the effectiveness of both PIs were much larger than that of Peg-IFN (Fig. 4B), the total antiviral effectiveness obtained by the combination of PI and Peg-IFN was largely similar to the one obtained with the PIs only.

After the VL was rapidly reduced as a result of the strong antiviral effectiveness of both PIs, the model predicted that a second slower phase of viral decline ensued, driven by the loss rate of infected cells, δ . We estimated δ to be equal to 0.18 day⁻¹, corresponding to a half-life of infected cells of 3.9 days, with no significant differences between patients receiving telaprevir and boceprevir ($P=0.5$).

Next we investigated the relationship between the PK-VK parameters and SVR. Among the 7 patients (47%) who achieved SVR, 5 received telaprevir and 2 received boceprevir (56% vs 33%, respectively, $P=0.6$). As shown in Fig. 5, neither the antiviral effectivenesses of PIs nor that of Peg-IFN was significantly associated with the long term virological response.

However the loss rate of infected cells, δ , was significantly higher in patients that subsequently achieved SVR (median $\delta^{SVR} = 0.27 \text{ day}^{-1}$ vs median $\delta^{non-SVR} = 0.14 \text{ day}^{-1}$, $P=0.03$). Lastly we verified that incorporating the effect of RBV exposure in the PK-VK model, either on the block of viral production or in the decrease of viral infectivity (data not shown) did not improve the fit of the data. Furthermore there was no significant association between the predicted C_{ss}^{RBV} and long term virological response ($P=0.5$).

Discussion

Here we used a PK-VK model to provide the first detailed picture of the relationship between the exposure to all drugs involved in triple therapy (Peg-IFN, RBV and telaprevir or boceprevir) and the early virological response. This novel model provides important insights into the understanding of the response to triple therapy in hard-to treat patients.

We predicted that both PIs achieved a high level of antiviral effectiveness in blocking viral production that was higher than 97.9% in all patients. However telaprevir had a higher intrinsic potency than boceprevir, as measured by EC_{50} ($P=0.008$ after correcting for small sample size), leading to a significantly higher level of antiviral effectiveness than boceprevir ($\varepsilon_{ss}^{telaprevir} = 99.8\%$ vs $\varepsilon_{ss}^{boceprevir} = 99.0\%$, $P=0.002$) *i.e.* a 5-fold difference in the viral production under treatment. Importantly the difference in EC_{50} was obtained despite the fact that the study was not randomized and that patients who received telaprevir had less favorable baseline characteristics than those who received boceprevir with higher baseline VL ($6.43 \log_{10} \text{IU/ml}$ vs $5.52 \log_{10} \text{IU/ml}$, respectively, $P<10^{-4}$) and a higher proportion of null responder to previous bitherapy (4/9 vs 1/6).

The comparison of drug's antiviral effectiveness should be taken with caution because of small sample size, the absence of randomization, and the fact that only trough concentrations were used to estimate the EC_{50} of PI which may lead to underestimation. Yet these results demonstrate for the first time a significant association between serum exposure to PI agents and the antiviral effectiveness achieved. To confirm the significance of this association we fitted HCV RNA data to a simplified model where drug exposure was not taken into account³⁷. As compared to this model, we found that the PK-VK model both improved the fitting criterion (BIC decreases from 181.3 to 176.3, *i.e.* an improvement of 5 points which is regarded as positive evidence) and reduced the between-patient parameter variability by 26% ($\omega_{EC_{50}PI}$ from 0.85 to 0.61), thus demonstrating that serum PK is an important predictor of the antiviral effectiveness of triple therapy.

Our estimate that telaprevir achieves an antiviral effectiveness of 99.8% is largely similar to the one found in naïve patients¹⁵, suggesting that compensated cirrhosis does not affect the maximal antiviral effectiveness of telaprevir. Whether this is also true for boceprevir is not

known as to our knowledge there is no published viral kinetic modeling study evaluating the *in vivo* antiviral effectiveness of boceprevir.

In contrast to the high effectiveness achieved by both PIs, Peg-IFN was found to have a modest contribution in blocking viral production, with a mean value of 43.4%. Of note including the patient who did not receive Peg-IFN in our analysis allow us to add information on telaprevir antiviral effectiveness. Further RBV exposure had no significant contribution on the early viral kinetics. Together these results indicate that Peg-IFN and RBV have a minimal contribution on the early virologic response, at least on this population of previous non-responders to a Peg-IFN/RBV therapy.

In order to achieve a rapid viral decline, it is important to achieve not only a high level of effectiveness but also a rapid second phase of viral decline. Here the latter was rather slow in both treatment groups compared to what had been than found in telaprevir treated patients, and this was attributed in our model to a low loss rate of infected cells, δ , about three times smaller than in non-cirrhotic naive-patients (δ of 0.18 day⁻¹ vs 0.60 day⁻¹)^{15,16}. Those lower values may encompass several factors, such a lower penetration of PIs into infected cells in a highly scarced liver. Because the loss rate of infected cells is strongly related to the treatment duration needed to achieve SVR¹⁵, our results suggest that the time to achieve SVR in this population could be longer than what had been predicted from clinical trials¹⁵. Consistent with this prediction, the relapse rate in the CUPIC trial was equal to 41% in both treatment groups¹³, *i.e.*, much higher than what reported in treatment experienced patients phase III clinical trials (12% to 27%)^{9,11,22}.

Regarding the use of early viral kinetic parameters for treatment prediction, we found that δ was higher in patients that subsequently achieved SVR (median $\delta^{SVR} = 0.27$ day⁻¹ vs median $\delta^{non-SVR} = 0.14$ day⁻¹, P=0.03) suggesting that δ could be a relevant predictor of the outcome of triple therapy, as it was the case for Peg-IFN/RBV bitherapy³⁸. In contrast there was no significant relationship between antiviral effectiveness of PIs on SVR (Fig. 5A). This absence of relationship is consistent with the hypothesis that in order to achieve SVR, it is necessary not only to have a high antiviral effectiveness at treatment initiation, when the viral population is predominantly wild-type and drug-sensitive, but also at later times, when the viral population is predominantly resistant to PI agents^{39,40}. The fact that neither Peg-IFN effectiveness nor RBV were associated with SVR is more surprising, as one would expect these agents to be equally active against wild-type and resistant virus. However our patient population was both treatment experienced and cirrhotic, two major causes of insensitivity to Peg-IFN/RBV.

Clearly the main limitation of this study was its small size. In a previous study we evaluated by simulation the power to detect a difference of antiviral effectiveness between two treatment groups for a variety of designs³⁴. With a design comparable to the present study,

i.e., 10 patients per group, 7 VL per patient and an antiviral effectiveness of 99% *vs* 99.9%, the power to detect this difference was 100% with the same statistical method that we used in this analysis. Yet, further studies on larger populations will still be needed to estimate more precisely the exposure-effect relationship (Fig. 4) and other kinetic parameters involved on the long-term virologic response. A second limitation is that only trough pre-dose drug concentrations were collected and modeled. Thus C_{ss} is the steady-state C_{trough} . Moreover no information was collected on treatment adherence. The data analysis did not show any signal of lack of adherence such as viral oscillations, which indicates that missed doses, if they occurred, did not have a major effect on the observed kinetic of decline. Here we considered that concentrations of PIs were constant over time. Detailed pharmacokinetic analysis showed that steady state of residual concentrations is attained after two days of treatment⁴¹. As explained in details in Guedj *et al.*⁴², the fact that we neglected this initial build up may explain why our estimate of the viral clearance rate, c , was lower than previously found in treatment naïve patients¹⁵. Further the lack of information on the time of Peg-IFN injection also precluded a precise characterization between Peg-IFN exposure and the virological response. The fact that we used rather empirical models is less problematic for RBV, whose long elimination half-life resulting in a slow increase over time could be well characterized here²⁷. Moreover, as mentioned previously, in order to achieve SVR, it is important for drugs to achieve a higher effectiveness against PI-resistant virus. Because no sequencing was done here, we focused only the early virological response where presumably the virus is predominantly drug-sensitive. In order to estimate PI effectiveness against resistant virus it would be needed to quantify and follow the proportion of resistant virus over time, as early as possible, for instance using pyrosequencing⁴³.

A greater proportion of patients that received boceprevir were genotype 1a relative to those that received telaprevir ($P=0.04$). It has been well established that subgenotype is an important predictor of the response to treatment and for instance the fact that telaprevir has a higher genetic barrier to resistance with genotype 1b than 1a³⁶ may explain why genotype non-1a patients were preferentially treated with telaprevir than boceprevir. However the effect of subgenotype on the early viral kinetics, where most of the virus is drug-sensitive is unknown, and has never been investigated as far as we know. In our study no significant effect of subgenotype on any of the parameters (c , δ , EC_{50}^{PI}) was found.

The effect of RBV was analyzed using serum drug concentrations. Some authors preferably used erythrocyte RBV concentration⁴⁴, which was not measured in the present study. However a significant relationship was shown between erythrocyte RBV concentrations and serum concentrations⁴⁵, suggesting that serum RBV can be used for the assessment of early and sustained virological responses^{46,47}.

To summarize this study provides the first characterization of the relationship between drug concentrations involved in triple therapy and early HCV viral kinetics treated with telaprevir or boceprevir. We found that median values of antiviral effectiveness for telaprevir was similar to what had been found in treatment naïve patients and significantly larger than in boceprevir treated patients. In all patients the second phase of viral decline was slow and may explain the high relapse rate observed in the ANRS-CO20-CUPIC cohort. This suggests that, notwithstanding safety issues, longer treatment duration could improve the treatment efficacy and lead to a higher SVR rate. Lastly the antiviral effectiveness of Peg-IFN was modest (less than 50%) suggesting that cirrhotic treatment experienced-patients may particularly benefit from upcoming IFN-free treatment. Our approach, which shows the importance of PK data to disentangle the effects of drug combination and to understand the variability in the virological response, is not specific to triple therapy and could also be used to optimize future IFN-free regimen, in particular in hard-to-treat patients.

Acknowledgements

The study was sponsored and funded by The National Agency for research on Aids and viral Hepatitis (ANRS) and in part by the Association Française pour l'Etude du Foie (AFEF).

The authors thank Ventzislava Petrov Sanchez and Setty Allam (from unit Basic and Clinical research on viral hepatitis, French National Agency for research on Aids and viral Hepatitis, Paris, France) and Cécilie Dufour (from Inserm UMR 707, University Pierre et Marie Curie, Paris, France). The authors thank Dr Marie Anne Loriot (from Inserm UMR 1147, University Paris Descartes, Paris, France) for genotyping the IL28B rs12979860 polymorphism.

Author Contributions: CL, FM, and JG made the analysis and drafted the manuscript; all authors provided the data; all authors read and approved the final manuscript.

Disclosure statement

JG: has consulted with Gilead SC.

FZ: received speakers/consulting fees from Gilead SC, MSD, BMS, Janssen cilag, Abbvie, Boehringer Ingelheim.

CH: has been a clinical investigator, speaker and/or consultant for Abbvie, Boehringer Ingelheim, BMS, Gilead Sciences, Janssen, Merck Sharp & Dohme, and Roche.

PM: has been a clinical investigator, speaker and/or consultant for Roche, Gilead, Vertex, Novartis, Janssen - Tibotec, MSD, Boehringer, Abbott, Pfizer, Alios BioPharma.

GP: has received travel grants, consultancy fees, honoraria or study grants from various pharmaceutical companies, including Bristol-Myers-Squibb, Gilead SC, Janssen, Merck, ViiV Healthcare and Splicos.

References

1. World Health Organization. WHO Fact Sheet 164-Hepatitis C. Available at: <http://www.who.int.gate2.inist.fr/mediacentre/factsheets/fs164/en/>. Accessed Januray 31, 2014.
2. Shepard CW, Finelli L, Alter, MJ. 2005. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect. Dis.* 5:558–567.
3. Pearlman BL. 2012. Protease inhibitors for the treatment of chronic hepatitis C genotype-1 infection: the new standard of care. *Lancet Infect. Dis.* 12:717–728.
4. Poordad F, McCone J Jr, Bacon BR, Bruno S, Manns MP, Sulkowski MS, Jacobson IM, Reddy KR, Goodman ZD, Boparai N, DiNubile MJ, Sniukiene V, Brass CA, Albrecht JK, Bronowicki J-P. 2011. Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *N. Engl. J. Med.* 364:1195–1206.
5. McHutchison JG, Everson GT, Gordon SC, Jacobson IM, Sulkowski M, Kauffman R, McNair L, Alam J, Muir AJ. 2009. Telaprevir with peginterferon and ribavirin for chronic HCV genotype 1 infection. *N. Engl. J. Med.* 360:1827–38.
6. Asselah T, Marcellin P. 2014. Second-wave IFN-based triple therapy for HCV genotype 1 infection: simeprevir, faldaprevir and sofosbuvir. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver.* 34:60–68.
7. Deuffic-Burban S, Schwarzingner M, Obach D, Mallet V, Pol S, Pageaux GP, Canva V, Deltenre P, Roudot-Thoraval F, Larrey D, Dhumeaux D, Mathurin P, Yazdanpanah Y. 2014. Should we await IFN-free regimens to treat HCV genotype 1 treatment-naïve patients? A cost-effectiveness analysis (ANRS 12188). *J. Hepatol. In press.*
7. Flamm SL, Lawitz E, Jacobson I, Bourlière M, Hezode C, Vierling JM, Bacon BR, Niederau C, Sherman M, Goteti V, Sings HL, Barnard RO, Howe JA, Pedicone LD, Burroughs MH, Brass CA, Albrecht JK, Poordad F. 2013. Boceprevir with peginterferon alfa-2a-ribavirin is effective for previously treated chronic hepatitis C genotype 1 infection. *Clin. Gastroenterol. Hepatology* 11:81–87.
8. Zeuzem S, Andreone P, Pol S, Lawitz E, Diago M, Roberts S, Focaccia R, Younossi Z, Foster GR, Horban A, Ferenci P, Nevens F, Müllhaupt B, Pockros P, Terg R, Shouval D, van Hoek B, Weiland O, Van Heeswijk R, De Meyer S, Luo D, Boogaerts G, Polo R, Picchio G, Beumont M, REALIZE Study Team. 2011. Telaprevir for retreatment of HCV infection. *N. Engl. J. Med.* 364:2417–2428.
9. McHutchison JG, Manns MP, Muir AJ, Terrault NA, Jacobson IM, Afdhal NH, Heathcote EJ, Zeuzem S, Reesink HW, Garg J, Bsharat M, George S, Kauffman RS, Adda N, Di Bisceglie AM. 2010. Telaprevir for previously treated chronic HCV infection. *N. Engl. J. Med.* 362:1292–303.

- 491 10. Bacon BR, Gordon SC, Lawitz E, Marcellin P, Vierling JM, Zeuzem S, Poordad F,
492 Goodman ZD, Sings HL, Boparai N, Burroughs M, Brass CA, Albrecht JK, Esteban R. 2011.
493 Boceprevir for previously treated chronic HCV genotype 1 infection. *N. Engl. J. Med.*
494 364:1207–1217.
- 495 11. Hézode C, Fontaine H, Dorival C, Larrey D, Zoulim F, Canva V, de Ledinghen V,
496 Poynard T, Samuel D, Bourlière M, Zarski JP, Raabe JJ, Alric L, Marcellin P, Riachi G,
497 Bernard PH, Loustaud-Ratti V, Métivier S, Tran A, Serfaty L, Abergel A, Causse X, Di Martino
498 V, Guyader D, Lucidarme D, Grando-Lemaire V, Hillon P, Feray C, Dao T, Cacoub P, Rosa I,
499 Attali P, Petrov-Sanchez V, Barthe Y, Pawlotsky JM, Pol S, Carrat F, Bronowicki JP; CUPIC
500 Study Group. 2013. Triple therapy in treatment-experienced patients with HCV-cirrhosis in
501 a multicentre cohort of the French Early Access Programme (ANRS CO20-CUPIC). *J.*
502 *Hepatol.* 59:434-441.
- 503 12. Hezode C, Fontaine H, Dorival C, Zoulim F, Larrey D, Canva V, de Ledinghen V,
504 Poynard T, Samuel D, Bourlière M, Alric L, Raabe J-J, Zarski J-P, Marcellin P, Riachi G,
505 Bernard P-H, Loustaud-Ratti V, Chazouilleres O, Abergel A, Guyader D, Metivier S, Tran A,
506 di Martino V, Causse X, Dao T, Lucidarme D, Portal I, Cacoub P, Gournay J, Grando-
507 Lemaire V, Hillon P, Attali P, Fontanges T, Rosa I, Petrov-Sanchez V, Barthe Y, Pawlotsky J-
508 M, Pol S, Carrat F, Bronowicki J-P, the cupic study group. 2014. Effectiveness of Telaprevir
509 or Boceprevir in Treatment-experienced Patients with HCV Genotype 1 Infection and
510 Cirrhosis. *Gastroenterology*, in press.
- 511 13. Chatterjee A, Guedj J, Perelson AS. 2012. Mathematical modelling of HCV infection:
512 what can it teach us in the era of direct-acting antiviral agents? *Antivir. Ther.* 17:1171–1182.
- 513 14. Guedj J, Perelson AS. 2011. Second-phase hepatitis C virus RNA decline during
514 telaprevir-based therapy increases with drug effectiveness: implications for treatment
515 duration. *Hepatology* 53:1801-1808.
- 516 15. Adiwijaya BS, Kieffer TL, Henshaw J, Eisenhauer K, Kimko H, Alam JJ, Kauffman RS,
517 Garg V. 2012. A viral dynamic model for treatment regimens with direct-acting antivirals for
518 chronic hepatitis C infection. *PLoS Comput. Biol.* 8(1):e1002339.
- 519 16. Adiwijaya BS, Herrmann E, Hare B, Kieffer T, Lin C, Kwong AD, Garg V, Randle JC,
520 Sarrazin C, Zeuzem S, Caron PR. 2010. A multi-variant, viral dynamic model of genotype 1
521 HCV to assess the in vivo evolution of protease-inhibitor resistant variants. *PLoS Comput.*
522 *Biol.* 6(4):e1000745.
- 523 17. Fontaine H, Petitprez K, Roudot-Thoraval F, Trinchet J-C. 2007. Guidelines for the
524 diagnosis of uncomplicated cirrhosis. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 31:504–509.
- 525 18. Farnik H, El-Duweik J, Welsch C, Sarrazin C, Lötsch J, Zeuzem S, Geisslinger G, Schmidt
526 H. 2009. Highly sensitive determination of HCV protease inhibitors boceprevir (SCH

- 503034) and telaprevir (VX 950) in human plasma by LC-MS/MS. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 877:4001–4006.
19. Homma M, Jayewardene AL, Gambertoglio J, Aweeka F. 1999. High-performance liquid chromatographic determination of ribavirin in whole blood to assess disposition in erythrocytes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:2716–2719.
20. Boulestin A, Kamar N, Legrand-Abravanel F, Sandres-Saune K, Alric L, Vinel J-P, Rostaing L, Izopet J. 2004. Convenient biological assay for polyethylene glycol-interferons in patients with hepatitis C. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:3610–3612.
21. Kieran J, Schmitz S, O’Leary A, Walsh C, Bergin C, Norris S, Barry M. 2013. The relative efficacy of boceprevir and telaprevir in the treatment of hepatitis C virus genotype 1. *Clin. Infect. Dis.* 56:228–235.
22. Neumann AU, Lam NP, Dahari H, Gretch DR, Wiley TE, Layden TJ, Perelson AS. 1998. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science* 282:103–7.
23. Guedj J, Rong L, Dahari H, Perelson AS. 2010. A perspective on modelling hepatitis C virus infection. *J. Viral Hepat.* 17:825–833.
24. Shudo E, Ribeiro RM, Talal AH, Perelson AS. 2008. A hepatitis C viral kinetic model that allows for time-varying drug effectiveness. *Antivir. Ther.* 13:919–926.
25. Rong L, Dahari H, Ribeiro RM, Perelson AS. 2010. Rapid emergence of protease inhibitor resistance in hepatitis C virus. *Sci. Transl. Med.* 2:30ra32.
26. Pawlotsky J-M, Dahari H, Neumann AU, Hezode C, Germanidis G, Lonjon I, Castera L, Dhumeaux D. 2004. Antiviral action of ribavirin in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 126:703–714.
27. Rotman Y, Noureddin M, Feld JJ, Guedj J, Witthaus M, Han H, Park YJ, Park S-H, Heller T, Ghany MG, Doo E, Koh C, Abdalla A, Gara N, Sarkar S, Thomas E, Ahlenstiel G, Edlich B, Titerence R, Hogdal L, Rehermann B, Dahari H, Perelson AS, Hoofnagle JH, Liang TJ. 2014. Effect of ribavirin on viral kinetics and liver gene expression in chronic hepatitis C. *Gut* 63:161–169.
28. Mihm U, Welker M-W, Teuber G, Wedemeyer H, Berg T, Sarrazin C, Böhm S, Alshuth U, Herrmann E, Zeuzem S. 2014. Impact of ribavirin priming on viral kinetics and treatment response in chronic hepatitis C genotype 1 infection. *J. Viral Hepatology* 21:42–52.
29. Dixit NM, Layden-Almer JE, Layden TJ, Perelson AS. 2014. Modelling how ribavirin improves interferon response rates in hepatitis C virus infection. *Nature* 432:922–924.
30. Samson A, Lavielle M, Mentre F. 2006. Extension of the SAEM algorithm to left censored data in nonlinear mixed-effects model: Application to HIV dynamics model. *Comput. Stat. Data Anal.* 51:1562–1574.

- 564 31. Thiébaud R, Guedj J, Jacqmin-Gadda H, Chêne G, Trimoulet P, Neau D, Commenges
565 D. 2006. Estimation of dynamical model parameters taking into account undetectable
566 marker values. *BMC Med. Res. Methodol.* 6:38.
- 567 32. Guedj J, Pang PS, Denning J, Rodriguez-Torres M, Lawitz E, Symonds W, Perelson
568 AS. 2014. Analysis of the hepatitis C viral kinetics during administration of two nucleotide
569 analogues: sofosbuvir (GS-7977) and GS-0938. *Antivir. Ther.* 19:211-220.
- 570 33. Laouénan C, Guedj J, Mentré F. 2013. Clinical trial simulation to evaluate power to
571 compare the antiviral effectiveness of two hepatitis C protease inhibitors using nonlinear
572 mixed effect models: a viral kinetic approach. *BMC Med. Res. Methodol.* 13:60.
- 573 34. Holmes JA, Desmond PV, Thompson AJ. 2012. Does IL28B genotyping still have a
574 role in the era of direct-acting antiviral therapy for chronic hepatitis C infection? *J. Viral*
575 *Hepat.* 19:677-684.
- 576 43. Cunningham M, Foster GR. 2012. Efficacy and safety of telaprevir in patients with
577 genotype 1 hepatitis C infection. *Ther. Adv. Gastroenterol.* 5:139-151.
- 578 35. Laouénan C, Guedj J, Lapalus M, Khelifa-Mouri F, Martinot-Peignoux M, Boyer N,
579 Serfaty L, Bronowicki JP, Zoulim F, Mentré F, Marcellin P. 2013. Characterization of the
580 early viral kinetics in compensated cirrhotic treatment-experienced patients treated with
581 boceprevir and telaprevir. Abstract 08c. 48th annual meeting of the European Association
582 for the Study of the Liver (EASL), Amsterdam, The Netherlands.
- 583 37. Talal AH, Ribeiro RM, Powers KA, Grace M, Cullen C, Hussain M, Markatou M,
584 Perelson AS. 2006. Pharmacodynamics of PEG-IFN alpha differentiate HIV/HCV coinfectd
585 sustained virological responders from nonresponders. *Hepatology* 43:943-953.
- 586 38. Halfon P, Locarnini S. 2011. Hepatitis C virus resistance to protease inhibitors. *J.*
587 *Hepatol.* 55:192-206.
- 588 39. Sarrazin C, Zeuzem S. 2010. Resistance to direct antiviral agents in patients with
589 hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 138:447-462.
- 590 40. Yamada I, Suzuki F, Kamiya N, Aoki K, Sakurai Y, Kano M, Matsui H, Kumada H. 2012.
591 Safety, pharmacokinetics and resistant variants of telaprevir alone for 12 weeks in hepatitis
592 C virus genotype 1b infection. *J. Viral Hepat.* 19:e112-119.
- 593 41. Guedj J, Dahari H, Shudo E, Smith P, Perelson AS. 2012. Hepatitis C viral kinetics
594 with the nucleoside polymerase inhibitor mericitabine (RG7128). *Hepatology* 55:1030-
595 1037.
- 596 42. Chevaliez S, Rodriguez C, Pawlotsky J-M. 2012. New virologic tools for management
597 of chronic hepatitis B and C. *Gastroenterology* 142:1303-1313.
- 598 44. Inoue Y, Homma M, Matsuzaki Y, Shibata M, Matsumura T, Ito T, Kohda Y.
599 Erythrocyte ribavirin concentration for assessing hemoglobin reduction in interferon and
600 ribavirin combination therapy. 2006. *Hepatol. Res.* 34:23-27.

- 601 45. Dominguez S, Ghosn J, Cassard B, Melica G, Poizot-Martin I, Solas C, Lascaux AS,
602 Bouvier-Alias M, Katlama C, Lévy Y, Peytavin G. 2012. Erythrocyte and plasma ribavirin
603 concentrations in the assessment of early and sustained virological responses to pegylated
604 interferon-alpha 2a and ribavirin in patients coinfecting with hepatitis C virus and HIV. *J.*
605 *Antimicrob. Chemother.* 67:1449–1452.
- 606 46. Breilh D, Djabarouti S, Trimoulet P, Le Bail B, Dupon M, Ragnaud JM, Fleury H, Saux
607 MC, Thiébaut R, Chêne G, Neau D. 2009. Ribavirin plasma concentration predicts
608 sustained virological response to peginterferon Alfa 2a plus ribavirin in previously treated
609 HCV-HIV-coinfecting patients. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 52:428–430.
- 610 47. Morello J, Rodríguez-Novoa S, Jiménez-Nácher I, Soriano V. 2008. Usefulness of
611 monitoring ribavirin plasma concentrations to improve treatment response in patients
612 with chronic hepatitis C. *J. Antimicrob. Chemother.* 62:1174–1180.

Tables**Table 1. Main patient characteristics**

	Peg-IFN/RBV + telaprevir n=9	Peg-IFN/RBV + boceprevir n=6	Total n=15
Age (years), median [min-max]	55 [49-59]	53 [44-64]	55 [44-64]
Males, n (%)	8 (89)	4 (67)	12 (80)
HCV RNA (log ₁₀ IU/ml), median [min-max]	6.5 [6.0-6.8]	5.4 [4.9-6.6]	6.2 [4.9-6.8]
HCV genotype, n (%):			
1a	2 (22)	5 (83)	7 (47)
Non 1a	7 (78)	1 (17)	8 (53)
IL28B genotype (rs12979860), n (%):			
C/C	2 (22)	-	2 (13)
C/T	6 (67)	6 (100)	12 (80)
T/T	1 (11)	-	1 (7)
Response to previous bitherapy, n (%):			
Partial responder	-	2 (33)	2 (13)
Null responder	4 (44)	1 (17)	5 (33)
Relapser	3 (33)	3 (50)	6 (40)
Early discontinuation for adverse event	2 (22)	-	2 (13)

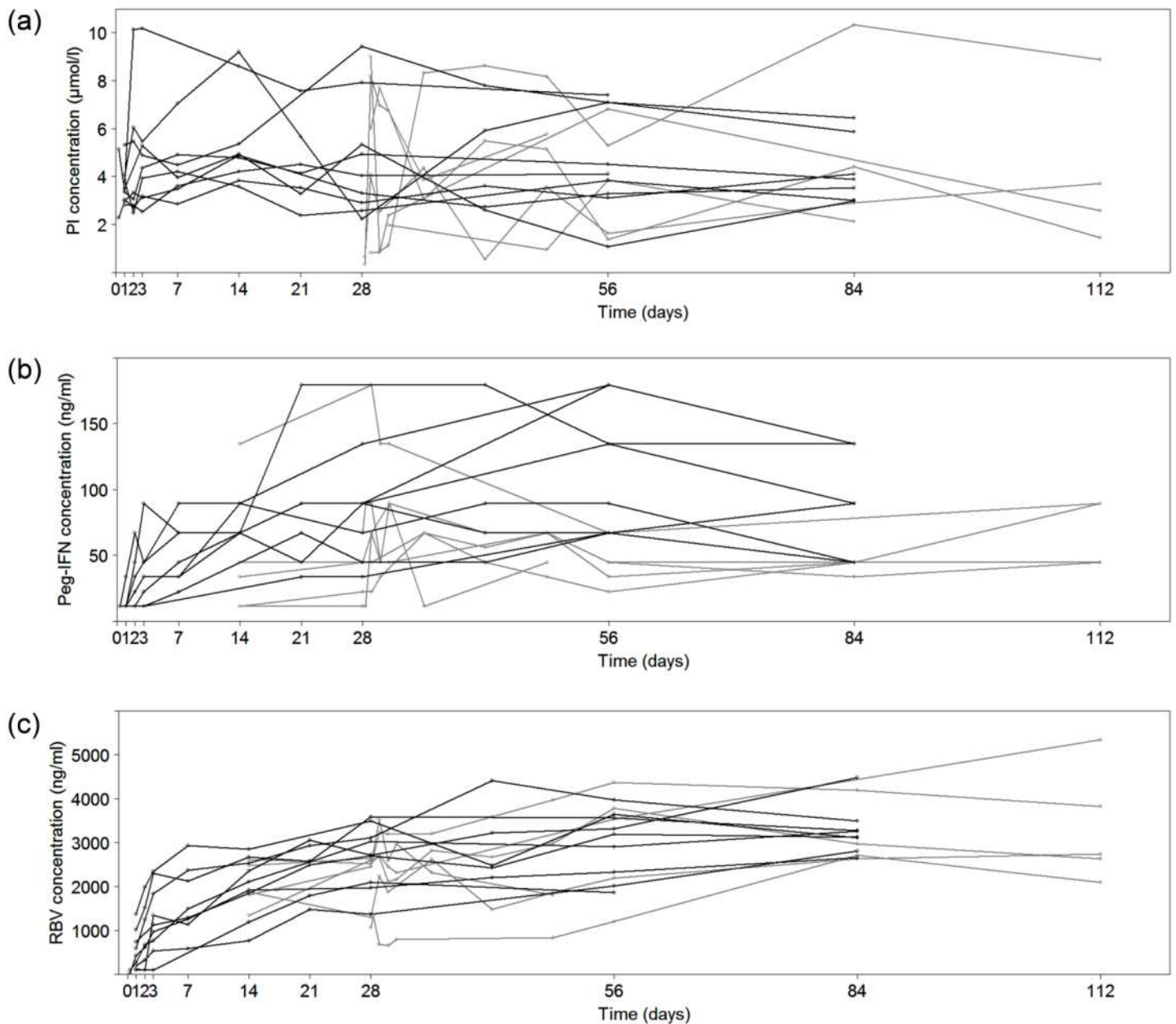
Table 2. Individual predicted trough concentrations at steady state (C_{ss})

	n	median [min; max]
$C_{ss}^{telaprevir}$ (μmol/l)	9	3.77 [2.68; 5.98]
$C_{ss}^{boceprevir}$ (μmol/l)	6	3.92 [3.22; 7.64]
$C_{ss}^{Peg-IFN-α2a}$ (ng/ml)	11	89.6 [52.8; 110.4]
$C_{ss}^{Peg-IFN-α2b}$ (ng/ml)	3	55.4 [55.3; 57.9]
C_{ss}^{RBV} (ng/ml)	15	2,860 [2,428; 3,874]

Table 3. Parameter estimates and relative standard errors (RSE)

	Estimate	RSE (%)
$V_0^{telaprevir}$ (\log_{10} IU/ml)	6.43	2
$V_0^{boceprevir}$ (\log_{10} IU/ml)	5.52	3
c (day^{-1})	3.98	12
δ (day^{-1})	0.18	11
$EC_{50}^{Peg-IFN}$ (ng/ml)	106	40
$EC_{50}^{telaprevir}$ ($\mu\text{mol/l}$)	0.009	30
$EC_{50}^{boceprevir}$ ($\mu\text{mol/l}$)	0.04	43
ω_{V_0}	0.07	20
ω_c	0.47	19
ω_δ	0.42	16
$\omega_{EC_{50}^{Peg-IFN}}$	0.67	30
$\omega_{EC_{50}^{PI}}$	0.61	32
σ	0.27	7

V_0 : baseline viral load; c : clearance rate of virus from serum; δ : loss rate of infected cells; EC_{50} : half maximal effective concentration; ω : inter-individual variability; σ : standard deviation of residual error; RSE: relative standard errors of parameter estimates, PI: protease inhibitor.

626 **Figures and figure legends**627 **Fig. 1: Observed concentrations over time.**

628 (a) Telaprevir in 9 patients (black, μmol/ml) and boceprevir in 6 six patients (grey,
 629 μmol/ml); (b) Peg-IFN in telaprevir group (black, ng/ml) and in boceprevir group (grey,
 630 ng/ml); (c) RBV in telaprevir group (black, ng/ml) and in boceprevir group (grey, ng/ml).
 631 Patients who received a boceprevir-based therapy had only two blood samples during the
 632 lead-in phase at baseline and week 2.

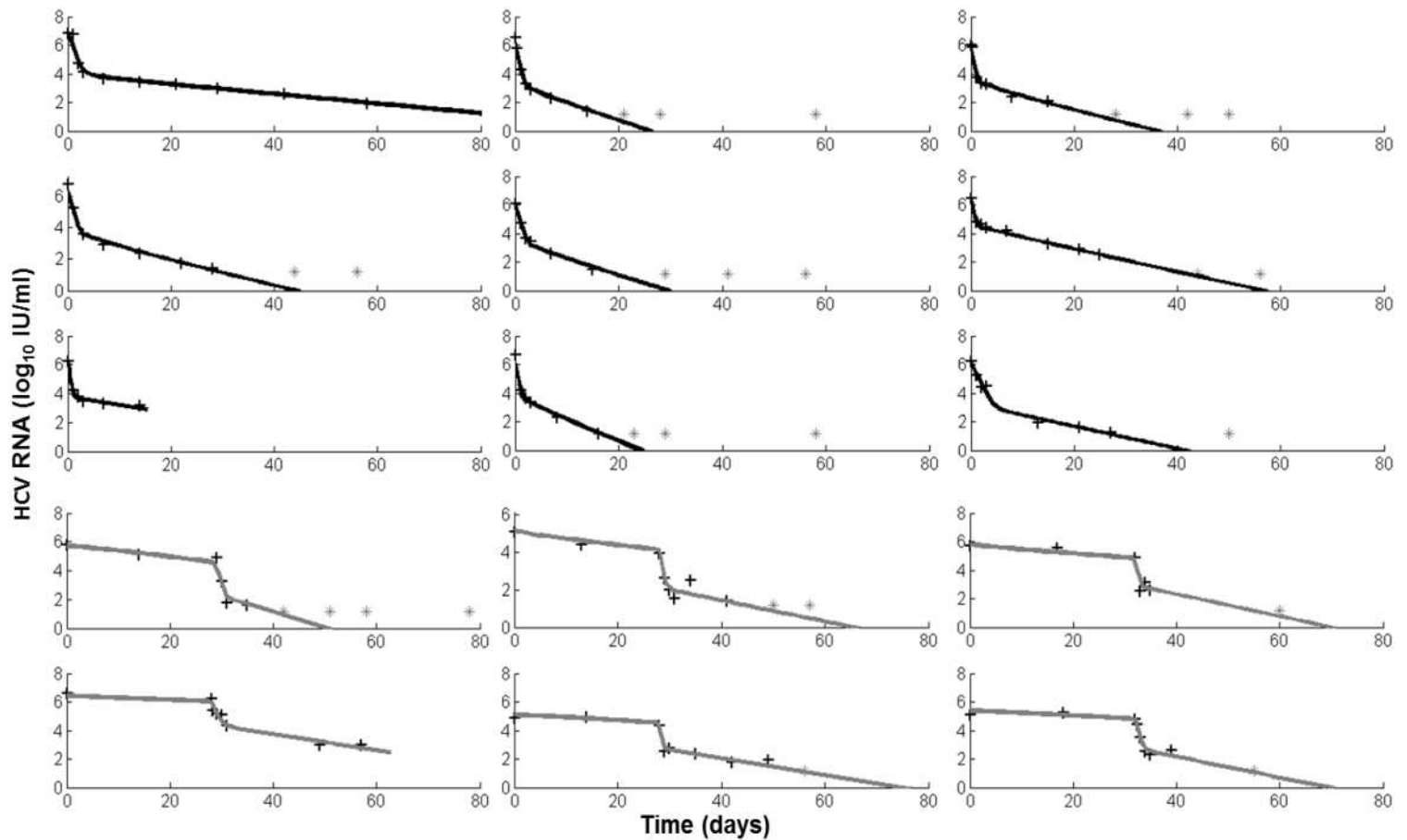


Fig. 2: Individual fits of the viral decline (\log_{10} IU/ml).

Nine patients in telaprevir group (black curve) and 6 patients in boceprevir group (grey curve). Black crosses represent the observed viral load and grey stars represent the viral load under the limit of detection.

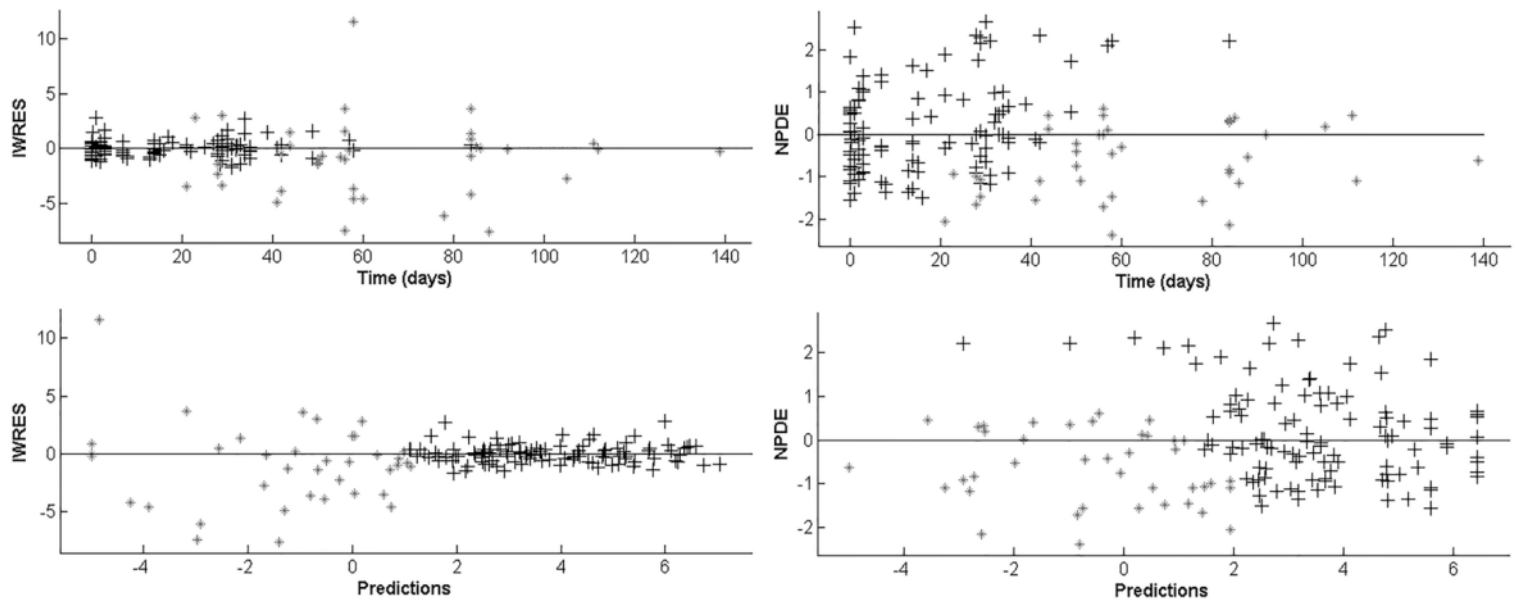


Fig. 3. Goodness-of-fit of the viral kinetic-pharmacokinetic model

Residuals (weighted residuals calculated using individual predictions: IWRES and normalized prediction distribution errors: NPDE) versus time and versus predictions plots.

Residuals seem to distribute homogenously around 0.

Observed viral load are plotted as black crosses and viral load under the limit of detection as grey stars.

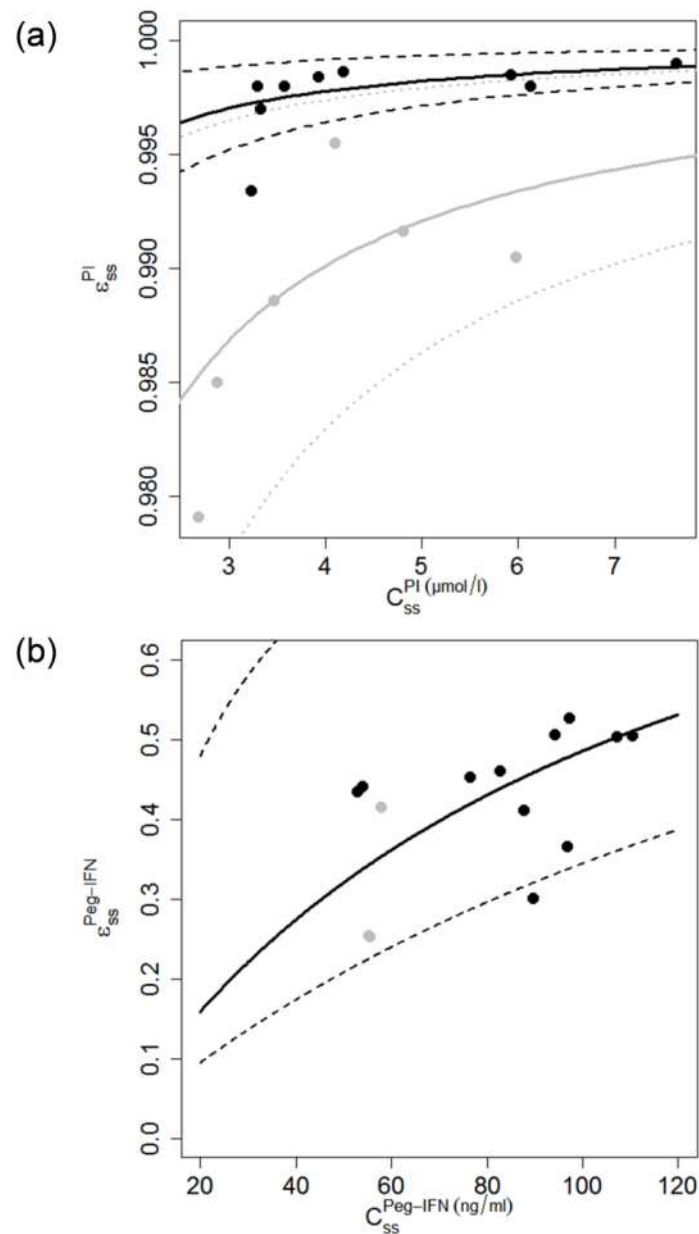


Fig. 4. Predicted relationship between predicted trough concentration at steady state (C_{ss}) and predicted antiviral effectivenesses (ϵ_{ss}).

(a) for protease inhibitors (PI) (telaprevir in black and boceprevir in grey, $\mu\text{mol/l}$); (b) for Peg-IFN (Peg-IFN- $\alpha 2a$ in black and Peg-IFN- $\alpha 2b$ in grey, ng/ml). The lines denote the prediction with the mean antiviral effectiveness and the dotted lines denote 95% confidence interval computed using the standard errors predicted by the Fisher Information Matrix.

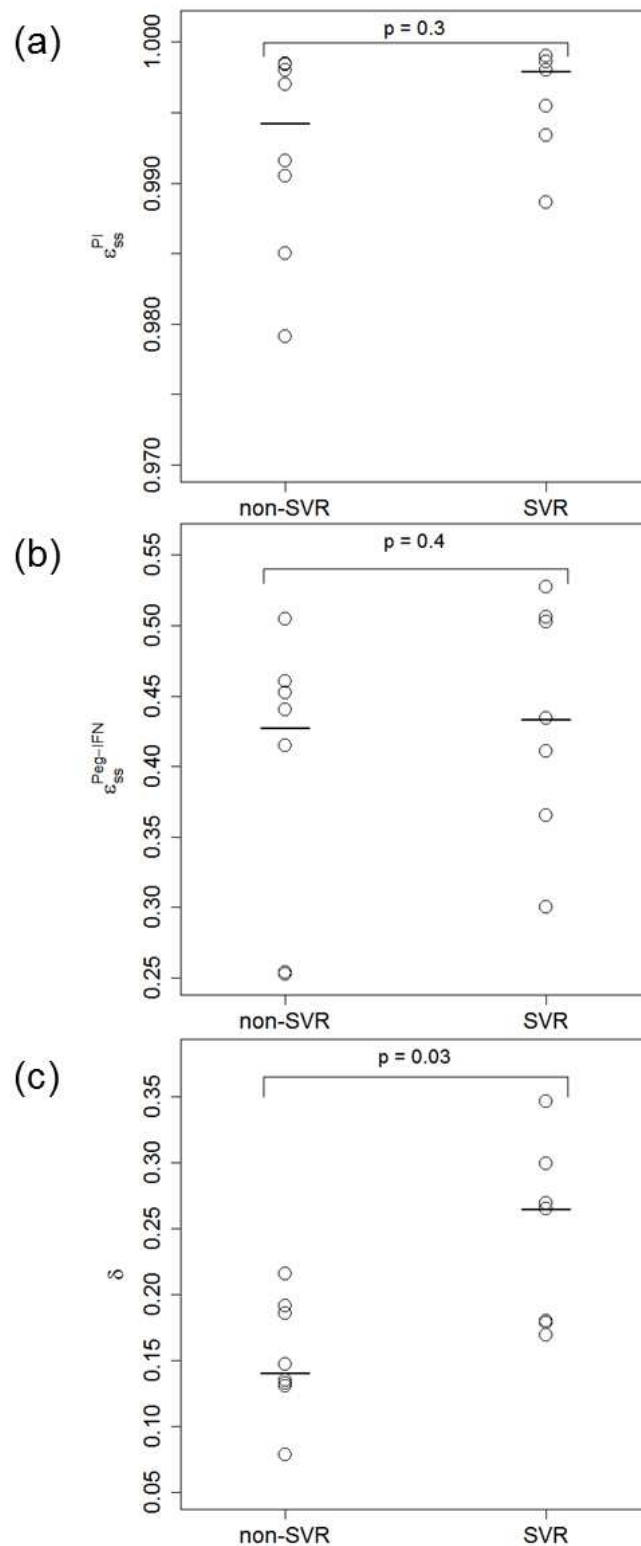


Fig. 5: Relationship between long term virological response (SVR) and parameters estimated by the viral kinetic-pharmacokinetic model.

(a) predicted antiviral effectivenesses of PIs (ϵ_{ss}^{PI}); (b) predicted antiviral effectivenesses of Peg-IFN ($\epsilon_{ss}^{Peg-IFN}$); (c) δ delta parameter (loss rate of infected cells). P-values from Wilcoxon tests.

3.3. Modélisation du lien entre concentrations et tolérance des trithérapies

3.3.1. Résumé

Nous avons vu que la réponse aux trithérapies chez les patients cirrhotiques reste mal connue et pose de sérieux problèmes de tolérance. Dans l'article publié dans le journal *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* nous avons donc démontré le lien entre les concentrations et l'efficacité antivirale des trithérapies. L'objectif du travail suivant était d'étudier le lien entre les concentrations et la tolérance des trithérapies dans cette population de patients à un stade avancé de la maladie dans le but de pouvoir proposer un meilleur suivi et une meilleure anticipation de la survenue d'événements indésirables sous traitement chez ces patients.

Dans la cohorte ANRS CO 20 CUPIC de patients atteints d'hépatite chronique C cirrhotiques et non répondeurs à une bithérapie antérieure traités par trithérapie, Hézode *et al.* (2014) ont reporté un taux élevé d'effets secondaires (50%). Plus précisément, 34% des patients avaient une anémie (taux d'hémoglobine < 10 g/dl) et 17% une thrombopénie (nombre de plaquette < 50 000 /mm³).

A partir des données longitudinales de tolérance recueillies dans l'étude ancillaire MODCUPIC, nous avons analysé avec des modèles semi-physiologiques l'anémie hémolytique induite par la ribavirine et la thrombopénie induite par le Peg-IFN- α . Il s'agissait donc de développer des modèles d'évolution de l'hémoglobinémie et du nombre de plaquettes et d'étudier le lien avec les concentrations résiduelles. Ces anémies hémolytiques induites par la ribavirine nécessitent le plus souvent une prescription d'érythropoïétine associée ou non à une transfusion sanguine et parfois une réduction de dose de la ribavirine ce qui peut affecter la réponse au traitement ou conduire à la réplication de virus résistants (Manns *et al.* 2001; Krishnan *et al.* 2012).

Les paramètres PK (C_{ss}^{RBV} , k^{RBV} , $C_{ss}^{Peg-IFN}$, $k^{Peg-IFN}$) sont issus des analyses de l'article précédent pour *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. L'effet de la ribavirine sur l'hémoglobinémie et du Peg-IFN- α sur le nombre de plaquettes ont été analysés par des modèles de réponse indirecte (décrits dans la partie 1.6) avec une hypothèse d'inhibition maximale. Les paramètres PD (Hb_{ϕ} , PLT_{ϕ} , k_{out}^{PLT} , k_{out}^{Hb} , $EC_{50}^{Peg-IFN}$, EC_{50}^{RBV}) de ces modèles ont été estimés par MNLEM à l'aide de l'algorithme SAEM implémenté dans le logiciel MONOLIX. A partir des paramètres individuels (EBE), le taux d'hémoglobine et le nombre de plaquettes à l'équilibre ont ensuite été calculés.

Nous avons montré que ces modèles permettaient de caractériser finement les liens entre concentrations et tolérance. Ces résultats ont confirmé les liens entre les concentrations de ribavirine et la diminution du taux d'hémoglobine et entre les concentrations de Peg-IFN- α et la diminution du nombre de plaquettes. De plus nous avons montré par simulation que 40% des patients devraient avoir une réduction de dose de ribavirine pour éviter la survenue d'une anémie inférieure à 10 g/dl et que 30% des patients devrait avoir une réduction de dose de Peg-IFN- α pour éviter la survenue d' une thrombopénie inférieure à 50 000 /mm³. Cela suggère que le suivi thérapeutique pharmacologique du Peg-IFN- α et de la ribavirine pourrait être un outil utile pour l'individualisation des traitements du VHC afin d'éviter des effets secondaires graves conduisant à l'interruption du traitement.

L'ensemble de ce travail est décrit dans un article en préparation sous la forme d'un commentaire suite à la publication des résultats de la tolérance de la cohorte ANRS CO 20 CUPIC (Hézode et al. 2014) dans le journal *Clinical Pharmacology & Therapeutics*.

3.3.2. Article 3 : *Clinical Pharmacology & Therapeutics*

Modelling effect of concentrations on anemia and thrombocytopenia in cirrhotic hepatitis C infected patients treated with Peg-IFN, ribavirin and a protease inhibitor (ANRS CO20-CUPIC)

Cédric Laouénan,^{a,b} Jeremie Guedj,^a Gilles Peytavin,^{a,c} Thi Huyen Tram Nguyen,^a Martine Lapalus,^d Feryel Khelifa-Mouri,^e Nathalie Boyer,^e Fabien Zoulim,^{f,g} Lawrence Serfaty,^h Jean-Pierre Bronowicki,^{i,j} Michelle Martinot-Peignoux,^d Olivier Lada,^d Tarik Asselah,^{d,e} Céline Dorival,^k Christophe Hézode,^{l,m} Fabrice Carrat,^{k,n} Florence Nicot,^o Patrick Marcellin,^{d,e} France Mentré,^{a,b}

INSERM, IAME, UMR 1137, Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France^a; AP-HP, Hôpital Bichat, Département of Biostatistic, Paris, France^b; AP-HP, Hôpital Bichat, Department of Clinical Pharmacokinetics, Paris, France^c; INSERM, CRI Paris Montmartre, UMR 1149, Univ Paris Diderot, Clichy, France^d; AP-HP, Hôpital Beaujon, Hepatology, Physiopathology and Treatment of Viral Hepatitis, Clichy, France^e; INSERM, UMR 1052, Univ Lyon, Lyon, France^f; Hospices Civils de Lyon, Department of Hepatology, Lyon, France^g; AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Department of Hepatology, Paris, France^h; INSERM, UMR 954, Univ Lorraine, Vandoeuvre-les-Nancy, Franceⁱ; Centre Hospitalier Universitaire de Nancy, Department of Hepatology, Vandoeuvre-les-Nancy, France^j; INSERM, UMR 1136, Univ Pierre et Marie Curie, Paris, France^k; INSERM, UMR 955, Univ Paris-Est, Créteil, France^l; AP-HP, Hôpital Henri Mondor, Department of Hepatology, Créteil, France^m; AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Department of public health, Paris, Franceⁿ; CHU Toulouse, IFB Purpan, Virology, laboratory, Toulouse, France^o.

Manuscript in preparation as a commentary for *Clinical Pharmacology & Therapeutics*.

Introduction

In the treatment of hepatitis C virus (HCV), the great gain in the treatment efficacy by the triple therapy including a protease inhibitors (PI), telaprevir or boceprevir, in combination with pegylated-interferon-alpha and ribavirin (Peg-IFN/RBV) offsets the problems with adverse events. The safety profile of these triple therapies is driven mainly by concerns with Peg-IFN and RBV, which are still part of the standard of care even with the recent approval of new direct acting antiviral agents. It is well known that RBV causes dose-dependent hemolytic anemia, leading to reduction in hemoglobin level¹⁻³, and Peg-IFN induces suppression of hematopoiesis, leading to reduction in platelets count⁴, in most treated patients. Furthermore, the addition of PIs is responsible for incremental anemia⁵⁻¹⁰ and the proportion of anemia is higher in cirrhotic than in non-cirrhotic patients^{8,11}.

Hézode *et al.* reported a high incidence of serious adverse events (49.9%) and a difficult management of anemia (erythropoietin, transfusion use and RBV dose reduction) in the large ANRS CO20-CUPIC cohort of genotype 1 cirrhotic experienced-patients treated with triple therapy¹¹. More precisely, the incidence of grade 2-3-4 anemia (≤ 9.0 g/dl) was 34.1% and the incidence of grade 3-4 thrombocytopenia ($\leq 50,000/\text{mm}^3$) was 17.0%. Furthermore, in this cohort, death or severe complications were associated to platelets count $\leq 100,000/\text{mm}^3$.

Here, we aimed to build, within a subset of 15 patients enrolled in the ANRS-CO20-CUPIC study, mathematical models of RBV-induced anemia and Peg-IFN-induced thrombocytopenia from measured trough concentrations of both drugs.

Materials and methods

Patients and data

MODCUPIC is a substudy of the French multicentre prospective ANRS-CO20-CUPIC cohort¹². In four centres, from September 2011 to September 2012, patients chronically monoinfected with HCV genotype 1, compensated cirrhosis (Child-Pugh class A), non-responders to a prior IFN-based therapy and who started triple therapy were recruited. Telaprevir-based therapy included 12 weeks of telaprevir (750 mg/8 hours) in combination with Peg-IFN- $\alpha 2a$ (180 $\mu\text{g}/\text{week}$) and RBV (1,000 or 1,200 mg/day, depending on body weight) then 36 weeks of Peg-IFN- $\alpha 2a$ /RBV (named group telaprevir in the following). Boceprevir-based therapy included 4 weeks (lead-in phase) of Peg-IFN- $\alpha 2b$ (1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{week}$) or Peg-IFN- $\alpha 2a$ (180 $\mu\text{g}/\text{week}$) and RBV (800 or 1,400 mg/day, depending on body weight) then 44 weeks of Peg-IFN- $\alpha 2b$ /RBV and boceprevir (800 mg/8 hours) (named group boceprevir in the following).

Written informed consent was obtained before enrolment. The protocol was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the "Ile-de-France IX Ethics Committee" (Créteil, France).

Data on safety profile (hemoglobin level and platelets count), trough drug concentrations and HCV RNA were collected post PIs initiation at hours 0, 8, days 1, 2, 3 and weeks 1, 2, 3, 4, 8 and 12. Patients treated with boceprevir had two additional visits during the lead-in phase. Use of erythropoietin was also recorded. Details of bioanalytical methods, drug pharmacokinetic modeling and viral kinetic modeling are available in Laouénan *et al.*¹².

Pharmacokinetic and pharmacodynamic model

Since the effect of RBV on hemoglobin decrease is predominant we did not incorporate the effect of other drugs into the reference hemoglobin model¹³. For the same reason, we first study the effect of Peg-IFN on platelets decrease. Simple pharmacokinetic (PK) models for trough concentration of RBV and Peg-IFN were used: an increasing exponential model from 0 to steady state concentration (C_{ss}) with rate constant k .

The effect of RBV on hemoglobin level and Peg-IFN on platelets count were described by turnover indirect models assuming a maximum inhibition of 100% at steady state:

$$\frac{dHb}{dt} = Hb_0 \times k_{out}^{Hb} \times \left(1 - \frac{C^{RBV}(t)}{C^{RBV}(t) + EC_{50}^{RBV}}\right) - k_{out}^{Hb} \times Hb(t)$$

$$\frac{dPLT}{dt} = PLT_0 \times k_{out}^{PLT} \times \left(1 - \frac{C^{Peg-IFN}(t)}{C^{Peg-IFN}(t) + EC_{50}^{Peg-IFN}}\right) - k_{out}^{PLT} \times PLT(t)$$

Where: Hb_0 is the baseline hemoglobin level, PLT_0 the baseline platelets count, k_{out}^{Hb} (k_{out}^{PLT}) the rate constant of hemoglobin (platelets) elimination, EC_{50}^{RBV} ($EC_{50}^{Peg-IFN}$) the half maximal effective RBV (Peg-IFN) concentration and $C^{RBV}(t)$ ($C^{Peg-IFN}(t)$) the trough RBV (Peg-IFN) concentration predicted by the PK model.

Data analysis and parameter estimation

Only hemoglobin and platelets data until erythropoietin use were analyzed. Two-sided Wilcoxon tests were used to compare the baseline hemoglobin level (boceprevir *vs* telaprevir groups) and the baseline platelets count (Peg-IFN- α 2a *vs* -2b groups). PK parameters (C_{ss}^{RBV} , k_{out}^{RBV} , $C_{ss}^{Peg-IFN}$, $k_{out}^{Peg-IFN}$) and pharmacodynamic (PD) parameters (Hb_0 , PLT_0 , k_{out}^{PLT} , k_{out}^{Hb} , $EC_{50}^{Peg-IFN}$, EC_{50}^{RBV}) were estimated sequentially using non-linear mixed-effect models (NLMEM). Exponential random effects models and proportional error models were assumed. Model parameters were estimated using the Stochastic Approximation Expectation Minimization (SAEM) algorithm in MONOLIX v4.2 (available at: <http://www.lixoft.eu>). Model evaluation was performed using goodness-of-fit plots, as well as the individual weighted residuals (IWRES) and the normalized prediction distribution errors (NPDE) over time. A Wald test on Hb_0 and EC_{50}^{RBV} was used to assess the influence of

gender for RBV-induced anemia. We also tested using the Bayesian information criteria (BIC) whether the addition of other drug concentrations had an effect in each model.

Prediction of individual dosage regimen avoiding toxicity

Individual Empirical Bayesian Estimates (EBE) parameters were estimated as Maximum A Posteriori. For each patient, from the EBEs, hemoglobin level and platelets count at steady state, Hb_{ss} and PLT_{ss} , given his/her dosing regimen of RBV and Peg-IFN, respectively, was predicted as:

$$Hb_{ss} = Hb_0 \times \left(1 - \frac{C_{ss}^{RBV}}{C_{ss}^{RBV} + EC_{50}^{RBV}}\right)$$

$$PLT_{ss} = PLT_0 \times \left(1 - \frac{C_{ss}^{Peg-IFN}}{C_{ss}^{Peg-IFN} + EC_{50}^{Peg-IFN}}\right)$$

where $\frac{C_{ss}^{RBV}}{C_{ss}^{RBV} + EC_{50}^{RBV}}$ and $\frac{C_{ss}^{Peg-IFN}}{C_{ss}^{Peg-IFN} + EC_{50}^{Peg-IFN}}$ represent the blocking production of hemoglobin and platelets, respectively. Two-sided Wilcoxon tests were used to compare Hb_{ss} and PLT_{ss} between treatment groups. If Hb_{ss} was predicted below 10 g/dl, the maximum dose of RBV leading to $Hb_{ss} \geq 10$ g/dl was defined. If PLT_{ss} was predicted below 50,000/mm³, the maximum dose of Peg-IFN leading to $PLT_{ss} \geq 50,000$ /mm³ was defined.

Results

Fifteen HCV genotype 1 patients were included in MODCUPIC study, 9 receiving telaprevir and 6 receiving boceprevir. Twelve (80%) were men, with a median [min-max] age of 55 [44-64] years. Eleven patients received Peg-IFN- α 2a (8 in telaprevir group and 3 in boceprevir group), 3 patients Peg-IFN- α 2b (all in boceprevir group) and one patient in telaprevir group did not receive any injection of Peg-IFN. The observed drug concentrations versus time, the estimated steady state trough concentrations, C_{ss} , and EC_{50} for all drugs were available in Laouénan *et al.*¹². Five patients received erythropoietin (2 in telaprevir group and 3 in boceprevir group) and hemoglobin level and platelets count were censored afterwards.

RBV-induced anemia

Median [range] baseline hemoglobin level was 15.1 g/dl [10.8-16.0] (15.4 g/dl [10.8-16.0] in telaprevir group and 14.5 g/dl [12.6-15.8] in boceprevir group, P=0.3). The hemoglobin level decreased over time in all patients (**Figure 1** and **Figure S1**) and could be well captured by our model with RBV concentration. There was no evidence of model misspecification as showed by the goodness-of-fit plot (**Figure S2**). Adding the other drugs (Peg-IFN and PIs) did not improve the fit of the data. There was no significant effect of gender on model parameters. The model predicted mean EC_{50}^{RBV} equals 7,090 ng/ml (**Table 1**), leading to a

median predicted hemoglobin level at steady state, Hb_{ss} , of 10.0 g/dl [7.8-11.8] (10.6 g/dl [7.8-11.6] in telaprevir group and 9.1 g/dl [8.0-11.8] in boceprevir group, $P=0.5$) corresponding to a median predicted change in hemoglobin level of 4.4 g/dl [2.1-6.6] (4.2 g/dl [2.1-5.5] in telaprevir group and 4.9 g/dl [3.3-6.6] in boceprevir group, $P=0.4$). **Figure 2** shows the relationship between individual estimated RBV concentration (C_{ss}^{RBV}) and effect (blocking production of hemoglobin). Six patients out of 15 (40%) had predicted $Hb_{ss} < 10$ g/dl using their current dose or RBV (**Table 2**). For those six patients the median predicted dose reduction of RBV to avoid anemia < 10 g/dl was 373 mg/day [45-670] (*i.e.* a median dose reduction of 31% [4-67]).

Peg-IFN-induced thrombocytopenia

One patient did not receive any injection of Peg-IFN and thus only 14 patients were analyzed for platelet changes. Median baseline platelets count was 125,500/mm³ [39,000-230,000] (126,000/mm³ [67,000-230,000] in Peg-IFN- α 2a patients and 80,000/mm³ [39,000-161,000] in Peg-IFN- α 2b patients, $P=0.4$). The platelets count decreased over time in all patients (**Figure 3 and Figure S3**) and could be well captured by our model with Peg-IFN concentration. There was no evidence of model misspecification as showed by the goodness-of-fit plot (**Figure S4**). Adding the other drugs (RBV and PIs) did not improve the fit of the data. The model predicted mean $EC_{50}^{Peg-IFN}$ equals 104 ng/ml (**Table 1**) leading to a median predicted platelets count at steady state, PLT_{ss} , of 66,720/mm³ [31,400-121,900] (67,270/mm³ [39,370-121,900] in Peg-IFN- α 2a patients and 60,000/mm³ [31,400-108,300] in Peg-IFN- α 2b patients, $P=0.7$) corresponding with a median predicted change in platelets count of 51,490/mm³ [16,670-108,400] (60,940/mm³ [32,210-108,400] in Peg-IFN- α 2a patients and 28,980/mm³ [16,670-53,760] in Peg-IFN- α 2b patients, $P=0.09$). **Figure 4** shows the relationship between individual Peg-IFN concentration ($C_{ss}^{Peg-IFN}$) and effect (blocking production of platelets). Four patients out of 14 (29%) had predicted $PLT_{ss} < 50,000$ /mm³ using the current dose or Peg-IFN, but one patient had already baseline PLT below 50,000/mm³ (**Table 3**). For those three patients the median predicted dose reduction of Peg-IFN to avoid thrombocytopenia $< 50,000$ /mm³ was 37 μ g/week [25-37] (*i.e.* a median dose reduction of 60% [57-70]).

Discussion

Complementing a previous pharmacokinetics/viral kinetics analysis¹² we used here mathematical models to characterize the relationship between drug concentrations and safety of triple therapy in cirrhotic experienced-patients HCV infected patients.

The aim of personal RBV therapeutic monitoring is to adjust an individual's dose and to increase the probability of achieving a sustained virological response (SVR) with acceptable

side effects. Recently, several studies have suggested monitoring plasma RBV concentrations as a tool for optimizing anti-HCV therapy for naive and previously treated HCV patients¹⁵, and in a randomized controlled trial Poordad *et al.* showed that RBV dose reduction can be the first strategy for anemia management and that reduction in RBV dosage throughout the course of triple therapy does not affect rates of SVR and that the patient have to receives at least 50% of the total amount RBV¹⁶.

We found that 40% of the patients should have a dose reduction of RBV to prevent anemia <10 g/dl. This threshold was chosen because RBV dose reductions and/or erythropoietin administration is indicated when hemoglobin is <10 g/dl¹⁴. For the Peg-IFN, we found that 30% of the patients should have a dose reduction to prevent thrombocytopenia <50,000/mm³.

In our previous analysis, unlike for RBV, we found for Peg-IFN a significant relationship between the serum concentration and the treatment response (early viral kinetics) with a mean 'effectiveness' $EC_{50}^{Peg-IFN}$ equals 106 ng/ml, leading to a low antiviral effectiveness of Peg-IFN at steady state of 43.4% [0.0-52.7]. Interestingly, in the present analysis, we found a very close value for the mean 'safety' $EC_{50}^{Peg-IFN}$ equals 104 ng/ml. So that the concentration of Peg-IFN required to inhibit 50% of the viral production is very close to the concentration of Peg-IFN required to inhibit 50% of the platelets production. This suggests a narrow therapeutic window and reinforces the interest of a Peg-IFN therapeutic monitoring.

A limitation of the study is the small sample size. These results would most likely be applicable to all RBV- and Peg-IFN/RBV-based regimens for HCV.

In this study, performed in the real-life setting of genotype 1 cirrhotic treatment experienced-patients treated with triple therapy, we found a relationship between the hemoglobin level and RBV exposure and between the platelets count and Peg-IFN exposure. This suggests that individual monitoring of Peg-IFN/RBV concentrations could be a useful tool for individualizing anti-HCV therapy in order to prevent severe side effects leading to treatment interruption.

Acknowledgements

The study was sponsored and funded by The National Agency for research on Aids and viral Hepatitis (ANRS) and in part by the Association Française pour l'Etude du Foie (AFEF). Sponsors had no role in interpretation of data, in the writing of the report, or in the decision to submit the paper for publication.

References

1. Tanaka, H., Miyano, M., Ueda, H., Fukui, K. & Ichinose, M. Changes in serum and red blood cell membrane lipids in patients treated with interferon ribavirin for chronic hepatitis C. *Clin. Exp. Med.* **5**, 190–195 (2005).
2. Sulkowski, M. S., Wasserman, R., Brooks, L., Ball, L. & Gish, R. Changes in haemoglobin during interferon alpha-2b plus ribavirin combination therapy for chronic hepatitis C virus infection. *J. Viral Hepat.* **11**, 243–250 (2004).
3. Morello, J., Rodríguez-Novoa, S., Jiménez-Nácher, I. & Soriano, V. Usefulness of monitoring ribavirin plasma concentrations to improve treatment response in patients with chronic hepatitis C. *J. Antimicrob. Chemother.* **62**, 1174–1180 (2008).
4. Hayashi, H., Beppu, T., Shirabe, K., Maehara, Y. & Baba, H. Management of thrombocytopenia due to liver cirrhosis: A review. *World J. Gastroenterol.* **20**, 2595–2605 (2014).
5. Poordad, F. *et al.* Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *N. Engl. J. Med.* **364**, 1195–1206 (2011).
6. Bacon, B. R. *et al.* Boceprevir for previously treated chronic HCV genotype 1 infection. *N. Engl. J. Med.* **364**, 1207–1217 (2011).
7. Jacobson, I. M. *et al.* Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.* **364**, 2405–2416 (2011).
8. Zeuzem, S. *et al.* Telaprevir for retreatment of HCV infection. *N. Engl. J. Med.* **364**, 2417–2428 (2011).
9. Kwo, P. Y. *et al.* Efficacy of boceprevir, an NS3 protease inhibitor, in combination with peginterferon alfa-2b and ribavirin in treatment-naïve patients with genotype 1 hepatitis C infection (SPRINT-1): an open-label, randomised, multicentre phase 2 trial. *Lancet* **376**, 705–716 (2010).
10. Flamm, S. L. *et al.* Boceprevir with peginterferon alfa-2a-ribavirin is effective for previously treated chronic hepatitis C genotype 1 infection. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **11**, 81–87 (2013).
11. Hézode, C. *et al.* Triple therapy in treatment-experienced patients with HCV-cirrhosis in a multicentre cohort of the French Early Access Programme (ANRS CO20-CUPIC) - NCT01514890. *J. Hepatol.* **59**, 434–441 (2013).
12. Laouénan, C. *et al.* Using pharmacokinetic and viral kinetic modeling to estimate the antiviral effectiveness of telaprevir, boceprevir and Peg-IFN during triple therapy in treatment-experienced HCV infected cirrhotic patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* In press (2014).
13. Sulkowski, M. S. Anemia in the treatment of hepatitis C virus infection. *Clin. Infect. Dis.* **37 Suppl 4**, S315–322 (2003).

- 236 14. French Agency for the Safety of Health Products. Epoetine beta. Boulogne-Billancourt,
237 France: Institut National du Cancer; 2011.
- 238 15. Solas, C., Paré, M., Quaranta, S., Stanke-Labesque, F. & Groupe Suivi Therapeutique
239 Pharmacologique de la Societe Francaise de Pharmacologie et de Therapeutique
240 [Evidence-based therapeutic drug monitoring for ribavirine]. *Thérapie* **66**, 221–230 (2011).
- 241 16. Poordad, F. *et al.* Effects of ribavirin dose reduction vs erythropoietin for boceprevir-
242 related anemia in patients with chronic hepatitis C virus genotype 1 infection-a
243 randomized trial. *Gastroenterology* **145**, 1035–1044 (2013).

Tables

Table 1. Parameter estimates and relative standard errors (RSE) of ribavirin-induced anemia and pegylated interferon-induced thrombocytopenia models.

Parameter (units)	Estimate	RSE (%)
Hb_0 (g/dl)	14.3	3
k_{out}^{Hb} (day ⁻¹)	0.09	23
EC_{50}^{RBV} (ng/ml)	7,090	12
ω_{Hb_0}	0.1	20
$\omega_{k_{out}^{Hb}}$	0.6	33
$\omega_{EC_{50}^{RBV}}$	0.4	23
σ	0.5	2
PLT_0 (/mm ³)	113,000	12
k_{out}^{PLT} (day ⁻¹)	0.3	81
$EC_{50}^{Peg-IFN}$ (ng/ml)	104	12
ω_{PLT_0}	0.4	19
$\omega_{k_{out}^{PLT}}$	2.0	32
$\omega_{EC_{50}^{Peg-IFN}}$	0.2	60
σ	9.6	11

Hb_0 : baseline hemoglobin level; k_{out}^{Hb} : loss rate of hemoglobin; EC_{50}^{RBV} : half maximal effective RBV concentration; PLT_0 : baseline platelets count; k_{out}^{PLT} : loss rate of platelets; $EC_{50}^{Peg-IFN}$: half maximal effective pegylated interferon concentration; ω : inter-individual variability; σ : standard deviation of residual error; RSE: relative standard errors of parameter estimates.

Table 2. Individual parameter estimates of the ribavirin-induced anemia model (Hb_0 , C_{ss}^{RBV} and Hb_{ss}) and proposed RBV dosage modifications for $Hb_{ss} \geq 10$ g/dl.

Patient	Treatment group	RBV dosage (mg/day)	Hb_0 (g/dl)	C_{ss}^{RBV} (ng/ml)	Hb_{ss} (g/dl)	Proposed RBV dosage for $Hb_{ss} \geq 10$ g/dl (mg/day)
1	Boceprevir	1000	15.5	2827	9.2	807
2	Boceprevir	1200	15.1	3874	8.4	781
3	Boceprevir	1200	14.4	3162	9.0	874
4	Boceprevir	1000	11.4	3092	8.0	330
5	Boceprevir	1200	15.4	2428	11.8	-
6	Boceprevir	1000	15.8	3820	11.4	-
7	Telaprevir	1000	12.8	2875	7.8	439
8	Telaprevir	1200	15.3	2746	9.9	1154
9	Telaprevir	1000	14.2	2602	10.7	-
10	Telaprevir	1200	15.3	2678	10.6	-
11	Telaprevir	1000	14.2	3008	10.0	-
12	Telaprevir	1000	13.1	2793	11.0	-
13	Telaprevir	1200	15.2	2958	11.6	-
14	Telaprevir	1200	13.22	2860	10.6	-
15	Telaprevir	1000	15.4	2621	10.1	-

Hb_0 : baseline hemoglobin level, C_{ss}^{RBV} : steady state trough RBV concentrations, Hb_{ss} : hemoglobin level at steady state (in bold if <10 g/dl).

Table 3. Individual parameter estimates of the pegylated interferon-induced thrombocytopenia model (PLT_0 , $C_{ss}^{Peg-IFN}$ and PLT_{ss}) and proposed Peg-IFN dosage modifications for $PLT_{ss} \geq 50,000/\text{mm}^3$.

Patient	Treatment group (Peg-IFN- α)	Peg-IFN dosage ($\mu\text{g}/\text{week}$)	PLT_0 ($/\text{mm}^3$)	$C_{ss}^{Peg-IFN}$ (ng/ml)	PLT_{ss} ($/\text{mm}^3$)	Proposed Peg-IFN dosage for $PLT_{ss} \geq 50,000/\text{mm}^3$ ($\mu\text{g}/\text{week}$)
1	2b	100	162,060	55.3	108,301	-
2	2b	100	88,981	57.9	59,999	-
3	2b	100	48,073 *	55.4	31,402	-
4	2a	180	193,480	52.8	121,874	-
5	2a	180	105,610	54.0	66,173	-
6	2a	180	228,620	96.7	120,264	-
7	2a	180	76,232	82.6	43,486	125
8	2a	180	116,480	76.4	67,267	-
9	2a	180	165,530	110.4	85,613	-
10	2a	180	134,960	97.2	74,015	-
11	2a	180	72,758	87.8	40,545	103
12	2a	135	123,540	107.1	56,680	-
13	2a	180	130,520	89.6	67,922	-
14	2a	180	84,863	94.2	39,365	109

PLT_0 : baseline platelets count, $C_{ss}^{Peg-IFN}$: steady state trough Peg-IFN concentrations, PLT_{ss} : platelets count at steady state (in bold if $<50,000/\text{mm}^3$). * One patient had already a baseline platelets count $<50,000/\text{mm}^3$.

267 **Figures**

268

269

270 **Figure 1: Observed hemoglobin level (g/dl) over time.**

271 Nine patients in telaprevir group (black) and 6 patients in boceprevir group (grey).

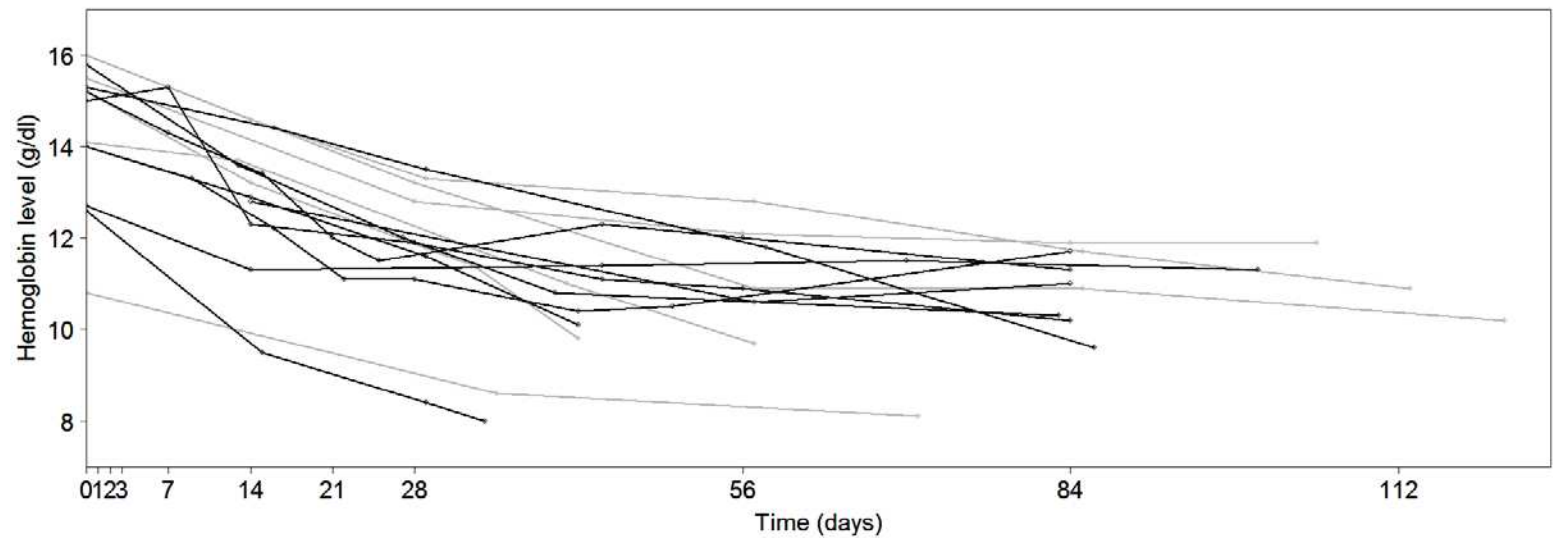
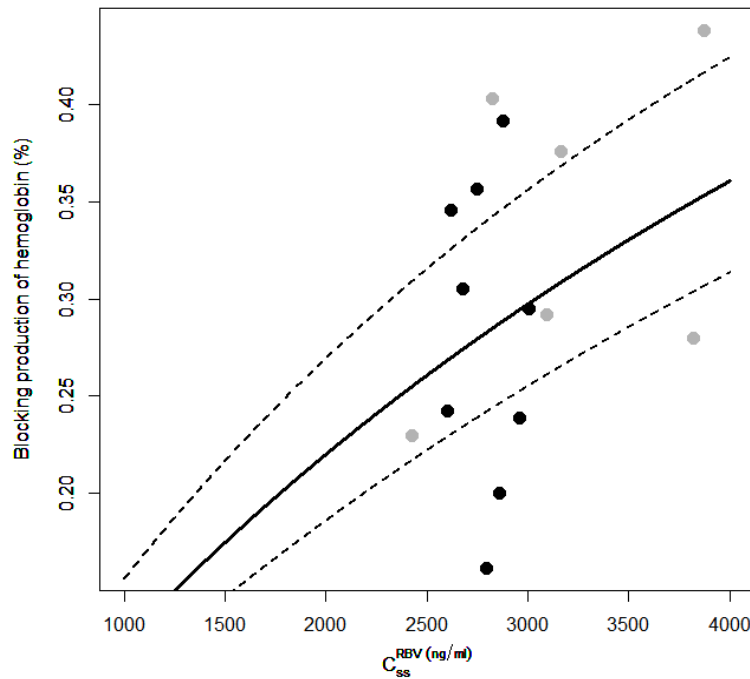


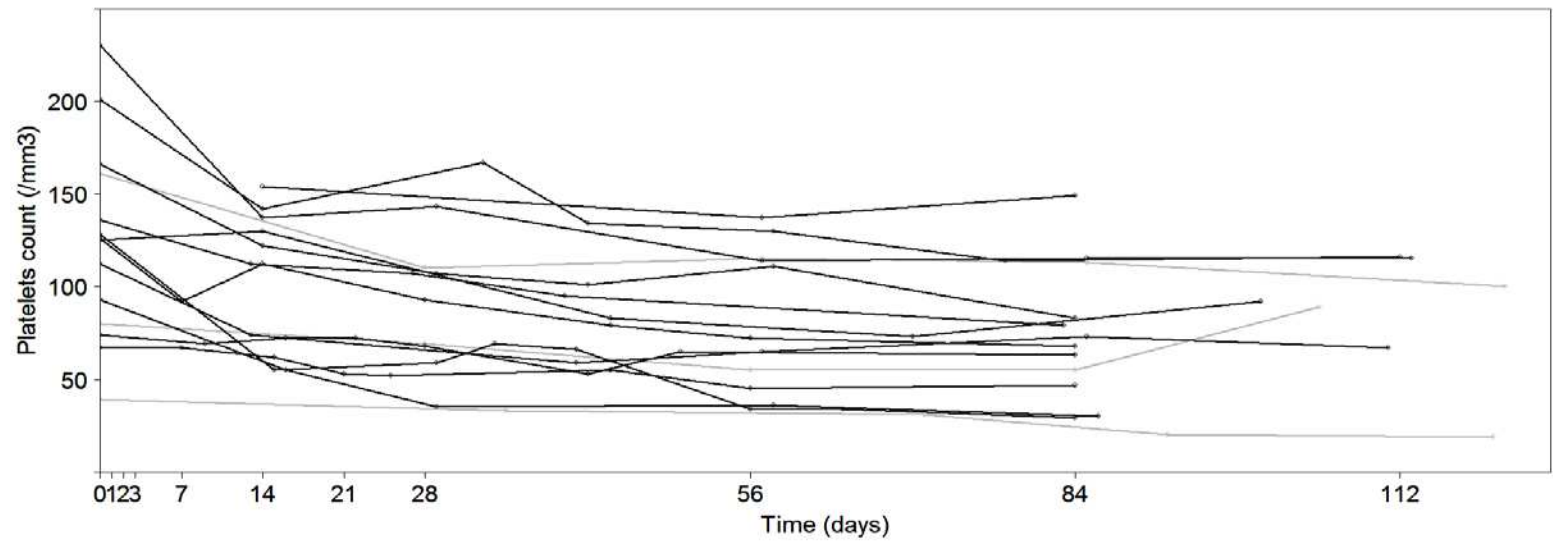
Figure 2: Relationship between RBV predicted trough concentration at steady state (C_{ss}^{RBV}) and predicted blocking production of hemoglobin ($\frac{C_{ss}^{RBV}}{C_{ss}^{RBV} + EC_{50}^{RBV}}$).

Nine patients in telaprevir group (black) and 6 patients in boceprevir group (grey). The line denotes the predictions with the mean blocking production of hemoglobin and the dotted lines denote 95% confidence interval computed with the standard errors predicted by the Fisher Information Matrix.

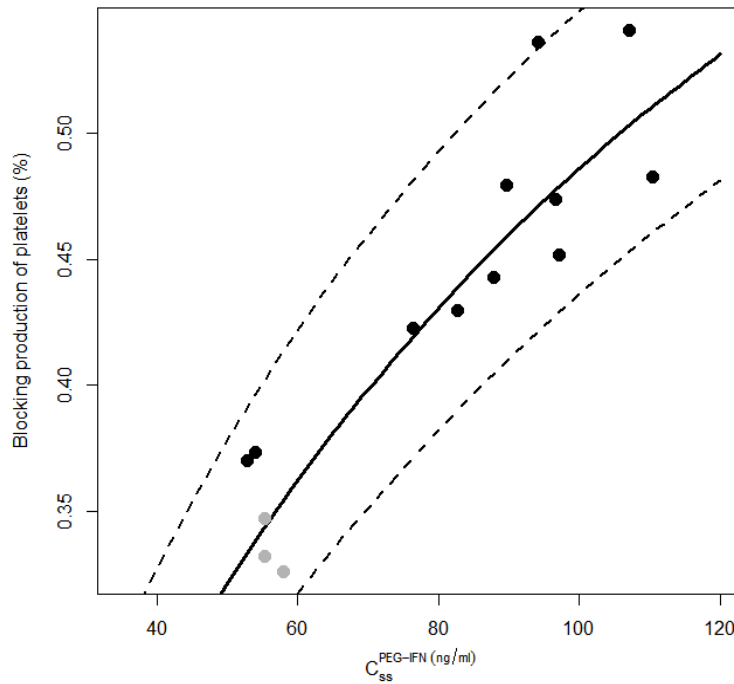


278 **Figure 3: Observed platelets count (/mm³) over time.**

279 Eleven patients in Peg-IFN- α 2a group (black) and 3 patients in Peg-IFN- α 2b group (grey).



280 **Figure 4: Relationship between peg-IFN predicted trough concentration at steady state (C_{ss})**
 281 **and predicted blocking production of platelets $\left(\frac{C_{ss}^{Peg-IFN}}{C_{ss}^{Peg-IFN} + EC_{50}^{Peg-IFN}}\right)$.**
 282 Eleven patients in Peg-IFN- α 2a group (black) and 3 patients in Peg-IFN- α 2b group (grey).
 283 The lines denote the predictions with the mean blocking production of platelets and the
 284 dotted lines denote 95% confidence interval computed with the standard errors predicted
 285 by the Fisher Information Matrix.



Supplementary material

Figure S1. Individual fits of the hemoglobin level

Nine patients in telaprevir group (black curve) and 6 patients in boceprevir group (grey curve). Black crosses represent the observed hemoglobin level and curves were predicted by the model.

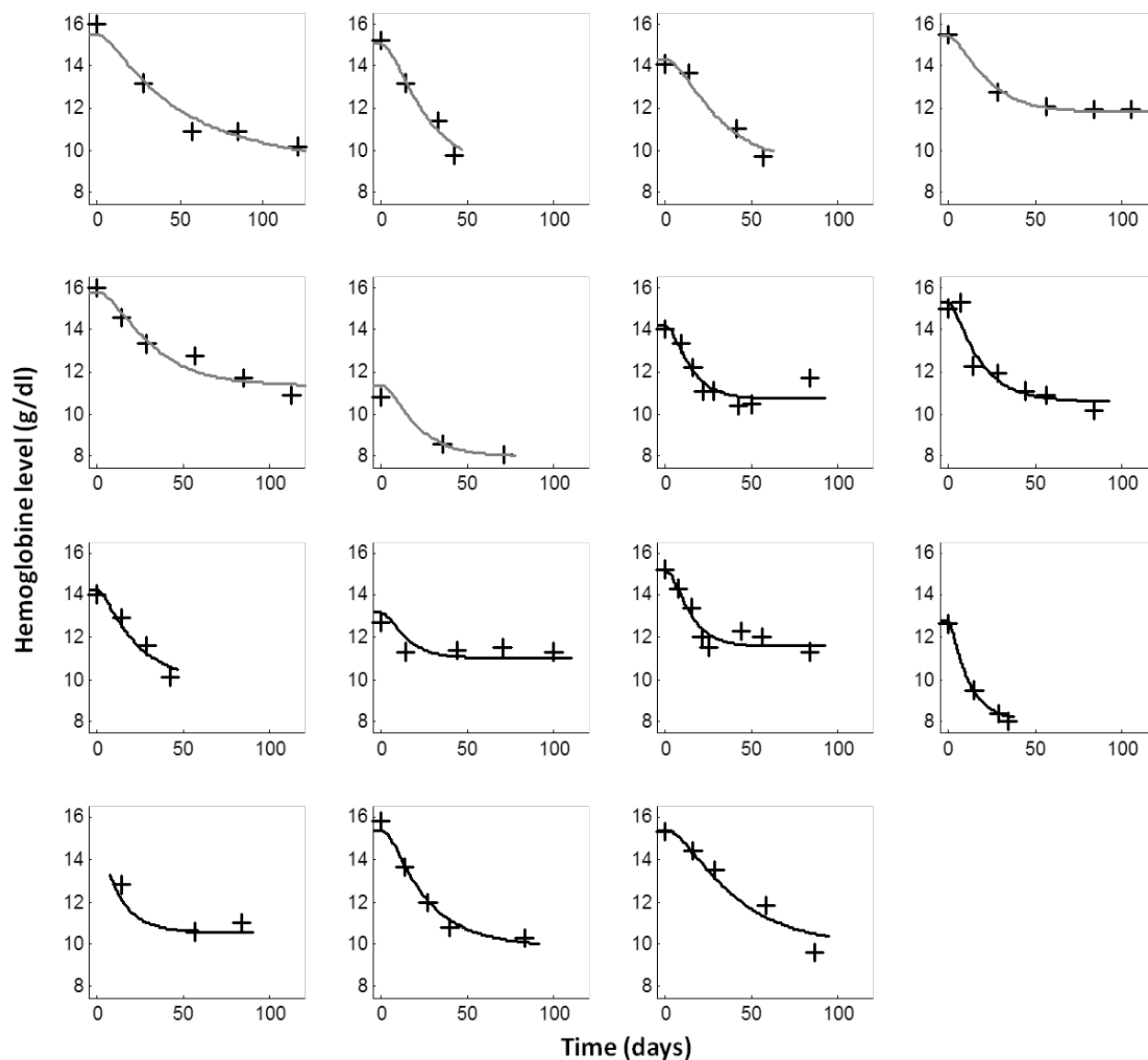
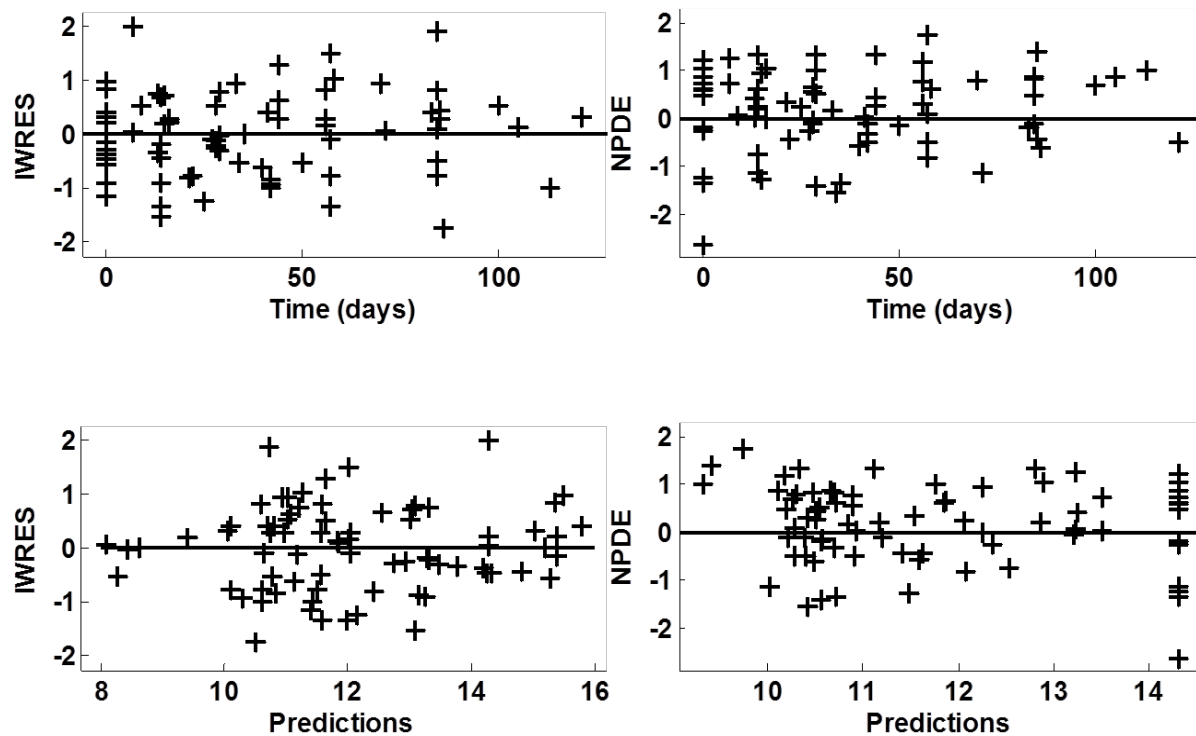


Figure S2. Goodness-of-fit of ribavirin-induced anemia model

Residuals (weighted residuals calculated using individual predictions: IWRES and normalized prediction distribution errors: NPDE) versus time and versus predictions plots. Residuals seem to distribute homogenously around 0.



296 **Figure S3. Individual fits of the platelets count**

297 Eleven patients in Peg-IFN- α 2a group (black curve) and 3 patients in Peg-IFN- α 2b group (grey curve). Black crosses represent the observed hemoglobin level and curves were
 298 predicted by the model.
 299

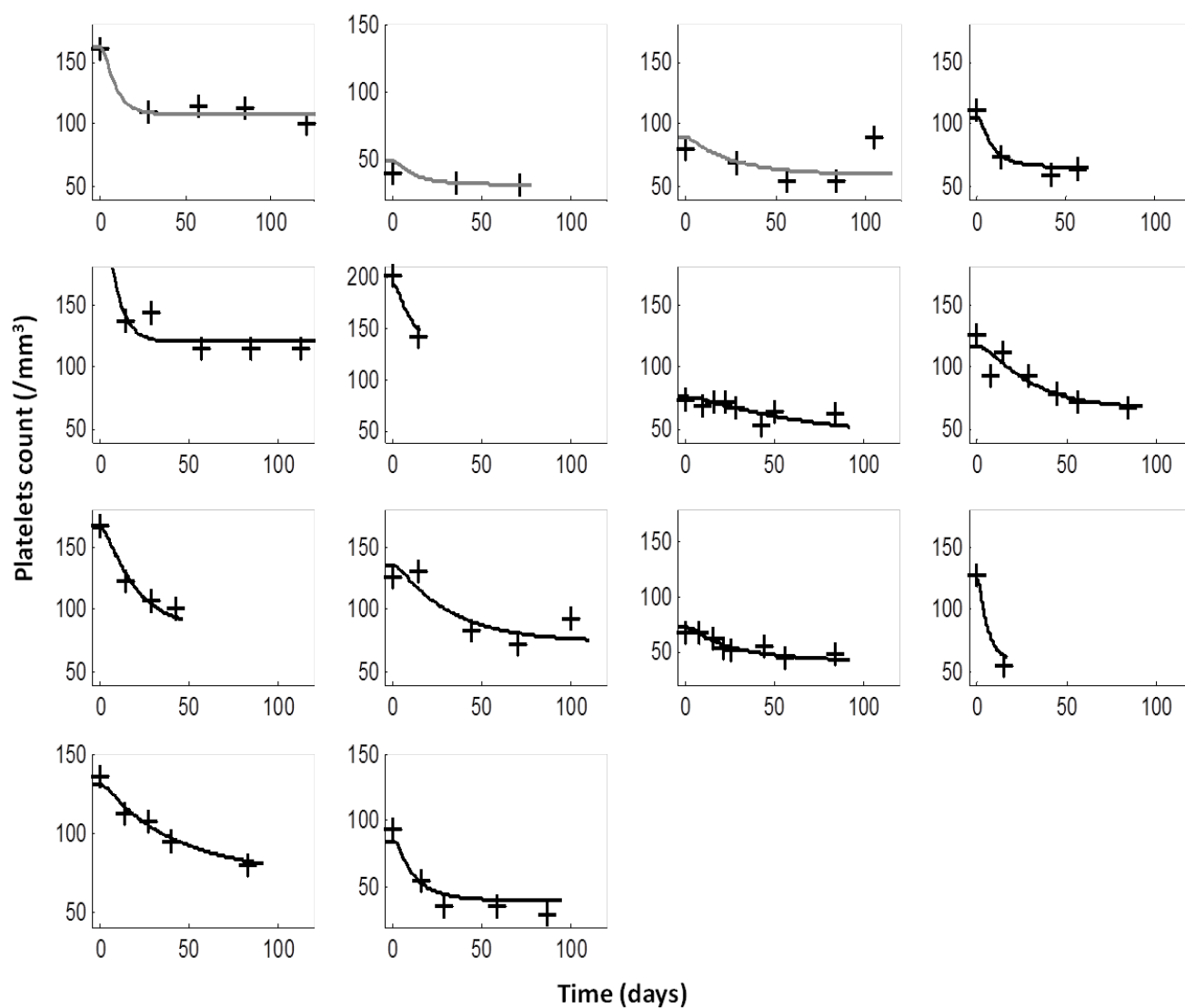
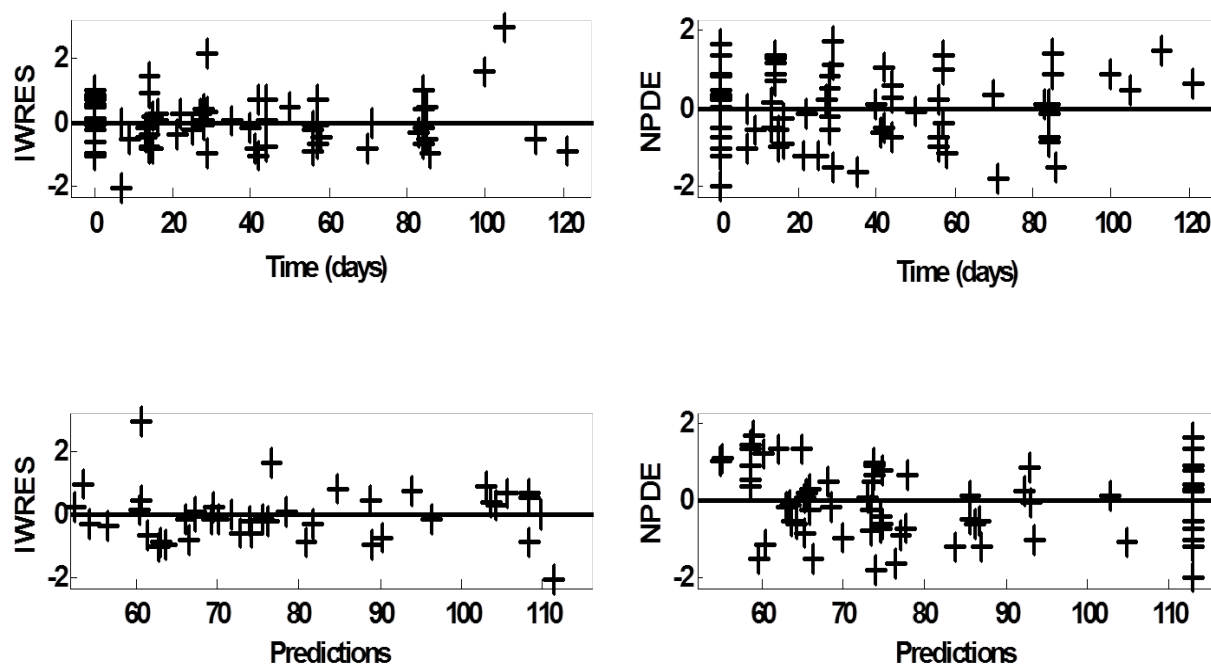


Figure S4. Goodness-of-fit of the pegylated interferon-induced thrombocytopenia model
Residuals (weighted residuals calculated using individual predictions: IWRES and normalized prediction distribution errors: NPDE) versus time and versus predictions plots. Residuals seem to distribute homogenously around 0.



4. Conclusion et perspectives

L'ensemble des méthodes utilisées dans cette thèse repose sur les MNLEM. Dans le domaine de l'évaluation thérapeutique, l'utilisation de ces modèles reste encore modeste dans les essais cliniques où sont disponibles des données longitudinales. Or ces modèles sont particulièrement bien adaptés à l'analyse de mesures répétées dans le temps et permettent de prendre en compte la variabilité inter-sujet et d'analyser en une étape toutes les données longitudinales collectées chez un groupe de patients. Ainsi, il est possible d'explorer l'influence de covariables explicatives sur la variabilité inter-sujet associée à chaque paramètre du modèle ou du processus physiologique mais aussi d'évaluer des effets traitements.

Dans notre étude de simulation d'essais cliniques, deux approches ont été comparées pour évaluer la puissance pour détecter une différence d'efficacité de deux traitements, l'une en utilisant le test asymptotique de Wald avec des MNLEM dans le cadre d'un modèle de dynamique virale du VHC et l'autre avec le test non paramétrique de Wilcoxon (sur le delta de charge virale). Cette étude illustre que l'analyse par modélisation de l'ensemble des charges virales permet d'avoir une meilleure puissance pour détecter une différence d'efficacité de deux traitements par rapport à l'approche statistique standard habituellement utilisée dans les essais thérapeutiques (comparaison du déclin de charge virale). Cela est un argument en faveur de la promotion de l'utilisation de ces modèles mixtes dans l'analyse des critères principaux des essais cliniques permettant de prendre en compte les évolutions sous traitement.

Cependant, nous avons démontré que le test asymptotique de Wald a des limites dans les MNLEM. En effet, notre étude confirme l'inflation de l'erreur de type I du test de Wald pour la comparaison des paramètres de population estimés dans ces modèles (test de l'effet d'une covariable ou comparaison de 2 groupes de traitement) lorsque le nombre de patients est faible. Dans ce cas nous suggérons d'utiliser une correction du seuil pour le test de Wald et ainsi limiter l'impact de cette inflation de l'erreur de type I. Nous avons utilisé une correction avec une approche de permutation dont la principale limite est le coût en temps de calcul, et qui rend impératif l'utilisation d'un algorithme rapide et numériquement stable. Cependant, d'autres corrections existent, et nous pouvons citer par exemple la correction de Galland (Gallant 1975). Cette correction de Galland a l'avantage de prendre en compte le nombre de sujets et le nombre d'effets fixes estimés et d'être plus économique en temps de calcul, mais sa performance devrait être confirmée par d'autres études de simulation (Bertrand et al. 2012). Dans cette étude de simulation nous avons évalué les performances du test de Wald. Mais d'autres tests asymptotiques existent et il

serait intéressant d'étudier notamment les propriétés du LRT. Des études de simulation précédentes, utilisant l'algorithme SAEM implémenté dans le logiciel MONOLIX, ont montré que les résultats de ce test étaient largement comparables (Bertrand et al. 2012). L'avantage du test de Wald par rapport au LRT est sa rapidité en temps de calcul car il ne nécessite pas le calcul de la vraisemblance par une méthode d'échantillonnage préférentiel (*important sampling*) et le LRT nécessite de calculer la vraisemblance du modèle avec puis sans la covariable. Nous n'avons pas non plus considéré le test du score. Ce test n'a pas été, à notre connaissance, utilisé avec des MNLEM dans le cadre d'un modèle de cinétique. De plus, il se situe par construction entre le LRT et le test de Wald. Ses performances devraient donc se situer à mi-chemin de celles obtenues avec le LRT et le test de Wald.

Dans ces travaux nous avons utilisé l'algorithme d'estimation SAEM basé sur une méthode exacte implémenté dans le logiciel MONOLIX. Il existe également un autre algorithme très utilisé, FOCE, basé sur une linéarisation de la vraisemblance implémenté dans le logiciel NONMEM (Johansson et al. 2014). De précédents travaux ont montré qu'avec l'algorithme FOCE les performances du test de Wald étaient moins bonnes que celles du LRT (à cause d'une moins bonne estimation de l'erreur standard du paramètre de la covariable avec FOCE) et que l'instabilité numérique de cet algorithme était une limite importante à son utilisation (Bertrand et al. 2009).

La proportion de patients avec une charge virale sous la LOD augmente avec l'efficacité des traitements, ce qui complique l'analyse longitudinale de ces charges virales car les données sous la LOD sont la source potentielle de biais pour l'estimation des paramètres. En comparant la précision des estimations suivant qu'une LOD était simulée ou non, nous avons montré que l'algorithme SAEM permet de prendre en compte de manière rigoureuse ces données sous la LOD ce qui est conforme avec des résultats antérieurs (Thiébaud et al. 2006). Nous avons retrouvé une inflation de l'erreur de type I plus importante avec l'approche où ces charges virales censurées sont prises en compte et estimées par l'algorithme SAEM par rapport à l'approche où toutes les charges virales simulées sous la LOD sont conservées. Ces résultats étaient attendus car il y a une perte d'information et cela d'autant plus dans le cadre de petits échantillons.

D'un point de vue clinique, nos résultats indiquent que l'augmentation de la taille de l'échantillon est à privilégier par rapport à de petits échantillons avec des prélèvements très fréquents de charges virales par patient. Ces résultats sont en accord avec d'autres études où il a été montré que pour un même nombre d'observation total la puissance des tests augmente avec un plus grand nombre de patients et moins de prélèvements par patient (Retout et al. 2007). Au vu des résultats de notre étude de simulation, nous

recommandons donc d'utiliser une correction du seuil du test de Wald pour la comparaison des paramètres estimés si le résultat du test est significatif. Dans le cas contraire, il n'est pas nécessaire d'utiliser cette correction. Une perspective de ce travail serait de pouvoir proposer, en fonction du design des essais cliniques, des recommandations sur les techniques statistiques adaptées à l'utilisation de la modélisation longitudinale. De plus, il serait intéressant et surtout plus rapide de proposer un calcul du nombre de sujets nécessaires dans ces approches basées sur les MNLEM pour avoir une bonne puissance pour détecter une différence d'efficacité de deux traitements. En effet la simulation d'essais cliniques est une approche très couteuse en temps et seulement un nombre limité de designs peuvent être étudiés. Le logiciel PFIM développé dans l'unité Inserm UMR 738 du Pr F Mentré (Bazzoli et al. 2010) est un outil pour la planification des protocoles de prélèvements. Le logiciel permet le calcul de la matrice d'information de Fisher (FIM en anglais) par linéarisation dans des modèles définis par des EDO et fournit une bonne estimation des variances attendues des paramètres dans les conditions asymptotiques. En effet, la FIM est la borne asymptotique de la variance-covariance attendue des paramètres estimés par maximum de vraisemblance. L'étude de la FIM permet donc de rationaliser les essais cliniques en fournissant *a priori* la précision maximale des paramètres pour un protocole de prélèvements donné. En effet, le choix du protocole expérimental (nombre de patients, nombre de prélèvements par patients, dates des prélèvements) a une influence sur la précision d'estimation des paramètres et sur la puissance des tests. Ce choix du protocole doit se faire en tenant compte des contraintes expérimentales, des modèles mécanistiques et statistiques utilisés et des valeurs *a priori* des paramètres. Par ailleurs, le logiciel PFIM ne permet pas de prendre en compte une LOD.

Toujours dans le cadre de l'évaluation de la puissance pour détecter une différence d'efficacité de deux traitements, une seconde perspective de ce travail serait d'évaluer l'approche consistant à comparer les paramètres individuels estimés (EBE) par MNLEM de chaque groupe de traitement avec le test non paramétrique de Wilcoxon. Cette approche serait comparée à l'approche utilisant les tests asymptotiques sur les paramètres de population (Wald et LRT). Ce type de comparaison a été effectué dans le cadre des analyses de bioéquivalence (Dubois et al. 2011) mais jamais dans celui des modèles de dynamique virale.

En utilisant les données de l'essai ANRS MODCUPIC nous avons pu appliquer les conclusions de nos travaux méthodologiques et ainsi comparer l'effet différentiel de deux nouvelles stratégies de traitement de l'hépatite C par trithérapie (Peg-IFN- α + ribavirine +

un IP : telaprevir ou boceprevir) sur le degré de blocage de la production de virus (efficacité antivirale) chez des patients cirrhotiques et non répondeurs à une bithérapie antérieure.

Cet essai MODCUPIC a un faible effectif et n'est pas un essai thérapeutique randomisé. Une des limites de l'interprétation des résultats de l'essai est donc le risque d'un biais de confusion résiduel. De plus nous ne pouvons écarter un éventuel biais de prescription, notamment sur le fait que la telaprevir a été prescrit aux patients avec des caractéristiques cliniques moins favorables (charge virale initiale élevée et réponse nulle à une bithérapie antérieure). Pour limiter ce biais, la charge virale initiale a été prise en compte comme un paramètre dans le modèle. Dans cet essai non sponsorisé par l'industrie pharmaceutique, nous n'avons pu inclure que 15 patients (9 dans le groupe telaprevir et 6 dans le groupe boceprevir) du fait notamment de la fréquence des prélèvements qui était un frein aux inclusions, tant du côté des patients que des centres ayant participé à l'étude. Il faut cependant noter que ces effectifs sont habituels dans les analyses utilisant cette approche de modélisation (Guedj et Perelson 2011). En outre, notre étude de simulation d'essais cliniques (Laouénan et al. 2013) nous a permis de valider *a priori* le design de MODCUPIC pour la performance de l'estimation des paramètres de la cinétique virale du VHC sous trithérapie et la puissance pour détecter une différence d'efficacité antivirale *in vivo* entre le telaprevir et le boceprevir. En effet nous avons retrouvé une bonne puissance du test de Wald avec un scénario proche de MODCUPIC (10 patients par groupe et une différence d'efficacité attendue comparable). Cependant, le cas d'effectifs déséquilibrés entre les deux groupes n'a pas été envisagé dans cette étude de simulation et devrait être étudié. Lors de l'écriture du protocole de MODCUPIC nous avons planifié l'inclusion de 60 patients (30 par trithérapie) avec des prélèvements fréquents de charges virales et de concentrations des molécules à l'aide du logiciel PFIM. Au final, nous avons obtenu une bonne précision de l'estimation des paramètres comme le montrent les erreurs standard relatives (RSE) estimées dans le tableau 3 de l'article publié dans *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (partie 3.2) et le tableau 1 de l'article en préparation pour *Clinical Pharmacology & Therapeutics* (partie 3.3).

Cette étude était particulièrement originale du fait des données dont nous disposions (charges virales fréquentes dans les premières semaines de traitement, données de tolérance, concentrations du Peg-IFN- α , de la ribavirine et des IP). A notre connaissance, aucune autre étude n'a été publiée sur les relations entre les concentrations de ces trithérapies et la cinétique virale du VHC d'une part et la tolérance d'autre part. Notre analyse avec un modèle dynamique PK/VK a permis d'améliorer la connaissance de la réponse au traitement des patients infectés par le VHC à un stade avancé de la maladie

traités par trithérapie en condition réelle d'utilisation. En effet ces patients avaient été peu étudiés dans les essais de phase III de ces molécules.

Nous avons montré une différence significative des EC_{50} entre les deux IP avec un niveau comparable des concentrations molaires entre les deux molécules. Cela conduit à retrouver des efficacités antivirales significativement différentes ($\varepsilon^{telaprevir} = 99.8\%$ vs $\varepsilon^{boceprevir} = 99.0\%$, $P = 0.002$). A notre connaissance, il s'agit de la première étude publiée qui estime l'efficacité antivirale *in vivo* du boceprevir. Dans cette population, nous avons montré une faible efficacité antivirale du Peg-IFN- α ($\varepsilon^{Peg-IFN} = 43.4\%$) et la ribavirine n'avait pas d'effet significatif sur l'efficacité antivirale initiale. Ces résultats nous indiquent que le Peg-IFN- α et la ribavirine ont une contribution minime sur la réponse virologique précoce, mais il faut noter que ces patients étaient tous préalablement non répondeurs à cette bithérapie. Nous avons fait l'hypothèse de l'additivité des efficacités des molécules et donc utilisé un modèle de Bliss dans le modèle PK/VK. Cette hypothèse est cohérente avec le fait que les mécanismes d'action des molécules des trithérapies sont différents et indépendants (détaillés dans la partie 1.3) et, est consistante avec les analyses retrouvées dans la littérature (Rong et al. 2010 ; Adiwijaya et al. 2012). De plus nous avons également testé un modèle de Loewe (non indépendance des mécanismes d'action) mais cela n'améliorait pas les critères de fit du modèle.

Dans cette population, nous avons mis en évidence une seconde phase du déclin viral faible (c'est-à-dire une diminution de l'élimination des cellules infectées faible, $\delta = 0.18 \text{ jour}^{-1}$) par rapport aux patients naïfs non-cirrhotiques traités par telaprevir ($\delta = 0.60 \text{ jour}^{-1}$) (Guedj et Perelson 2011). Au final, cette valeur est proche des valeurs observées chez des patients naïfs traités uniquement par Peg-IFN- α /ribavirine (Chatterjee et al. 2012). Le déclin viral à long terme chez ces patients cirrhotiques en échec thérapeutique est donc plus lent que chez les patients naïfs non cirrhotiques. Nos résultats confirment que l'éradication du virus chez ces patients est plus difficile à obtenir. Cela peut être dû à plusieurs facteurs comme par exemple une moins bonne pénétration des molécules dans les cellules infectées dans un foie fortement fibrosé. Mais il paraît peu envisageable de proposer un allongement de la durée de traitement avec ces trithérapies compte tenu des répercussions en termes de tolérance qui doivent être prises en compte. Cela est donc cohérent avec l'idée que les nouveaux traitements AAD (sans Peg-IFN- α et/ou sans ribavirine) seront particulièrement bénéfiques à ces patients.

Nos résultats montrent l'importance de prendre en compte la pharmacocinétique dans la compréhension de la variabilité de la réponse au traitement. Par la suite, pour avoir un effectif plus important et ainsi une meilleure prédiction, ces mêmes modèles de

tolérance pourraient être appliqués aux données de plus grandes cohortes avec un suivi plus long jusqu'à 24 semaines après l'arrêt du traitement (la cohorte CUPIC par exemple). Ces modèles permettraient d'évaluer par simulation l'influence de différents schémas posologiques afin d'étudier plus finement leur influence sur l'efficacité antivirale à long terme et sur la tolérance. Cela nous permettrait de pouvoir envisager une meilleure individualisation des traitements dans cette population particulière de patients cirrhotiques et de proposer des ajustements posologiques et/ou la mise en place d'un suivi thérapeutique des concentrations et de la réponse virologique précoce.

De façon plus générale, nous pouvons nous poser la question de l'utilité clinique de la modélisation. En effet, il s'agit d'étudier dans quelle mesure la modélisation de la cinétique virale initiale est un moyen robuste de prédiction de la réponse au traitement et au bout de combien de temps après l'initiation du traitement. Et donc d'évaluer si la modélisation a de meilleurs résultats en termes de prédiction que les stratégies déjà existantes de traitement guidé par la réponse. Il faudrait également déterminer la quantité minimum d'information nécessaire pour avoir une prédiction correcte.

En outre, l'approche de modélisation que nous avons utilisée dans ces travaux pour distinguer les effets de chaque molécule n'est pas spécifique aux trithérapies et sera utile pour l'optimisation et la prédiction de la réponse virologique des nouvelles combinaisons thérapeutiques qui sont d'ores et déjà sur le marché ou en cours de développement (Osinusi et al. 2013). Cela sera sûrement particulièrement utile dans le contexte de ces patients cirrhotiques non répondeurs qui ont moins de chance d'avoir une RVS et de guérir.

Dans ces analyses, nous avons utilisé le modèle de cinétique virale standard. Ce modèle est parfaitement adapté pour modéliser le déclin biphasique observé chez tous les patients inclus dans l'essai MODCUPIC. D'autres modèles plus complexes ont été développés notamment pour pouvoir prendre en compte les mécanismes d'action des nouveaux traitements AAD. Par exemple, l'émergence de résistances avec ces traitements peut entraîner un rebond virologique extrêmement précoce et, Rong et al. (2010) ont montré qu'il était impossible de reproduire un rebond virologique aussi précoce avec des paramètres d'infection réalistes avec le modèle standard. D'autres modèles plus complexes existent permettant de capturer ces rebonds virologiques. Le modèle dit intracellulaire permet de prendre en compte la dynamique intracellulaire du virus qui est la cible privilégiée de ces AAD. Ce modèle a été étendu à un modèle avec deux souches de virus (sauvages et mutants préexistants) (Guedj et Neumann 2010). Plus récemment, un autre

modèle permet de prendre en compte différents modes d'action du médicament (Guedj et al. 2013).

La modélisation de la dynamique virale à laquelle nous nous sommes spécifiquement intéressés dans cette thèse n'est pas propre à l'infection par le VHC. Plusieurs approches similaires ont été proposées pour modéliser la dynamique des infections par d'autres virus (VIH, VHB) (Wei et al. 1995; Lewin et al. 2001; Ribeiro et al. 2002). La méthodologie développée dans cette thèse pourrait donc être appliquée à d'autres maladies infectieuses, notamment la tuberculose où il est possible d'étudier la décroissance bacillaire sous traitement (Davies et al. 2006; Grosset et al. 2012). De même, l'évolution de la taille de tumeurs cancéreuses peut être modélisée à partir de systèmes dynamiques représentant la multiplication des cellules tumorales, la vascularisation de la tumeur, ainsi que l'effet de traitements radiothérapeutiques ou chimiothérapeutiques (Powathil et al.; Komarova et Wodarz 2003; Ribba et al. 2012).

L'utilisation de cette méthodologie, avec un algorithme efficace d'estimation des paramètres, contribue donc à faire de l'approche dynamique un outil de référence d'analyse des suivis longitudinaux des patients infectés par le VHC et dans la compréhension des mécanismes biologiques en jeu.

5. Bibliographie

- Ahn JE, Karlsson MO, Dunne A, Ludden TM. Likelihood based approaches to handling data below the quantification limit using NONMEM VI. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*. 2008;35(4):401-421.
- Arase Y, Ikeda K, Tsubota A, Suzuki F, Suzuki Y, Saitoh S, et al. Significance of serum ribavirin concentration in combination therapy of interferon and ribavirin for chronic hepatitis C. *Intervirology*. 2005;48(2-3):138-144.
- Bacon BR, Gordon SC, Lawitz E, Marcellin P, Vierling JM, Zeuzem S, et al. Boceprevir for previously treated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med*. 2011;364(13):1207-1217.
- Bazzoli C, Retout S, Mentre F. Design evaluation and optimisation in multiple response nonlinear mixed effect models: PFIM 3.0. *Comput Methods Programs Biomed*. 2010;98(1):55-65.
- Beal SL. Ways to fit a PK model with some data below the quantification limit. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*. 2001;28(5):481-504.
- Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology*. 1996;24(2):289-293.
- Bergstrand M, Karlsson MO. Handling data below the limit of quantification in mixed effect models. *AAPS J*. 2009;11(2):371-380.
- Bertrand J, Comets E, Chenel M, Mentre F. Some alternatives to asymptotic tests for the analysis of pharmacogenetic data using nonlinear mixed effects models. *Biometrics*. 2012;68(1):146-155.
- Bertrand J, Comets E, Laffont CM, Chenel M, Mentre F. Pharmacogenetics and population pharmacokinetics: impact of the design on three tests using the SAEM algorithm. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*. 2009;36(4):317-339.
- Bourlière M. Molécules en cours de développement contre le virus de l'hépatite C - Document personnel. 2013.
- Bourlière M, Ouzan D, Rosenheim M, Doffoël M, Marcellin P, Pawlotsky J-M, et al. Pegylated interferon- α 2a plus ribavirin for chronic hepatitis C in a real-life setting: the Hepatys French cohort (2003-2007). *Antivir Ther*. 2012;17(1):101-110.
- Bruchfeld A, Lindahl K, Schvarcz R, Ståhle L. Dosage of ribavirin in patients with hepatitis C should be based on renal function: a population pharmacokinetic analysis. *Ther Drug Monit*. 2002;24(6):701-708.

- Burney T, Dusheiko G. Overview of the PROVE studies evaluating the use of telaprevir in chronic hepatitis C genotype 1 patients. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2011;9(2):151-160.
- Chatterjee A, Guedj J, Perelson AS. Mathematical modelling of HCV infection: what can it teach us in the era of direct-acting antiviral agents? *Antivir Ther.* 2012;17(6 Pt B):1171-1182.
- Comets E, Lavenu A, Lavielle M. saemix: Stochastic Approximation Expectation Maximization (SAEM) algorithm. R package version 1.0. 2011.
- Dahari H, Shudo E, Cotler SJ, Layden TJ, Perelson AS. Modelling hepatitis C virus kinetics: the relationship between the infected cell loss rate and the final slope of viral decay. *Antivir Ther.* 2009;14(3):459-464.
- Davies GR, Khoo SH, Aarons LJ. Optimal sampling strategies for early pharmacodynamic measures in tuberculosis. *J Antimicrob Chemother.* 2006;58(3):594-600.
- Dayneka NL, Garg V, Jusko WJ. Comparison of four basic models of indirect pharmacodynamic responses. *J Pharmacokinet Biopharm.* 1993;21(4):457-478.
- Deuffic-Burban S, Schwarzingier M, Obach D, Mallet V, Pol S, Pageaux G-P, et al. Should we await IFN-free regimens to treat HCV genotype 1 treatment-naïve patients? A cost-effectiveness analysis (ANRS 12188). *J Hepatol.* 2014. *Sous presse.*
- Dubois A, Lavielle M, Gsteiger S, Pigeolet E, Mentré F. Model-based analyses of bioequivalence crossover trials using the stochastic approximation expectation maximisation algorithm. *Stat Med.* 2011;30(21):2582-2600.
- Dubois F, Desenclos JC, Mariotte N, Goudeau A. Hepatitis C in a French population-based survey, 1994: seroprevalence, frequency of viremia, genotype distribution, and risk factors. The Collaborative Study Group. *Hepatol.* 1997;25(6):1490-1496.
- Duclos-Vallée J-C, Samuel D. La ribavirine. *Médecine Thérapeutique.* 2000;6(8):664-668.
- Duval V, Karlsson MO. Impact of omission or replacement of data below the limit of quantification on parameter estimates in a two-compartment model. *Pharm Res.* 2002;19(12):1835-1840.
- EMA. Sovaldi product information. 2014. Accessible à : http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_product_Information/human/002798/WC500160597.pdf. Consulté le 19 Mars 2014.
- EMA. Guideline on reporting the results of population pharmacokinetic analyses. Committee for Medicinal Products for Human Use, European Medicines Agency, 2006.
- Food and Drug Administration. Guidance for Industry : Population Pharmacokinetics. FDA, Rockville, Maryland, USA, 1999.

- Food and Drug Administration. Incivek prescribing information. 2013 a. Accessible à : http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/201917s012lbl.pdf. Consulté le 3 Décembre 2013.
- Food and Drug Administration. Olysio prescribing information. 2013 b. Accessible à : http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/205123s001lbl.pdf. Consulté le 19 Mars 2014.
- Food and Drug Administration. Sovaldi prescribing information. 2013 c. Accessible à : http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/204671s000lbl.pdf. Consulté le 19 Mars 2014.
- Food and Drug Administration. Victrelis prescribing information. 2013 d. Accessible à : http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/202258s009lbl.pdf. Consulté le 3 Décembre 2014.
- Foster GR. Pegylated interferons for the treatment of chronic hepatitis C: pharmacological and clinical differences between peginterferon-alpha-2a and peginterferon-alpha-2b. *Drugs*. 2010;70(2):147-165.
- Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Gonçales FL Jr, et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. 2002;347(13):975-982.
- Gallant AR. Seemingly unrelated nonlinear regressions. *J Econ*. 1975;3:35-50.
- Ge Z, Bickel P, Rice J. An approximate likelihood approach to nonlinear mixed effects models via spline approximation. *Comput Stat Data Anal*. 2004;46(4):747-776.
- Ghani AC, de Wolf F, Ferguson NM, Donnelly CA, Coutinho R, Miedema F, et al. Surrogate markers for disease progression in treated HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2001;28(3):226-231.
- Grosset J, Almeida D, Converse PJ, Tyagi S, Li S-Y, Ammerman NC, et al. Modeling early bactericidal activity in murine tuberculosis provides insights into the activity of isoniazid and pyrazinamide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(37):15001-15005.
- Guedj J, Dahari H, Pohl RT, Ferenci P, Perelson AS. Understanding silibinin's modes of action against HCV using viral kinetic modeling. *J Hepatol*. 2012 a;56(5):1019-1024.
- Guedj J, Dahari H, Rong L, Sansone ND, Nettles RE, Cotler SJ, et al. Modeling shows that the NS5A inhibitor daclatasvir has two modes of action and yields a shorter estimate of the hepatitis C virus half-life. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(10):3991-3996.
- Guedj J, Dahari H, Shudo E, Smith P, Perelson AS. Hepatitis C viral kinetics with the nucleoside polymerase inhibitor mericitabine (RG7128). *Hepatol*. 2012 b;55(4):1030-1037.

- Guedj J, Neumann AU. Understanding hepatitis C viral dynamics with direct-acting antiviral agents due to the interplay between intracellular replication and cellular infection dynamics. *J Theor Biol.* 2010;267(3):330-40.
- Guedj J, Perelson AS. Second-phase hepatitis C virus RNA decline during telaprevir-based therapy increases with drug effectiveness: implications for treatment duration. *Hepatology.* 2011;53(6):1801-1808.
- Hajarizadeh B, Grebely J, Dore GJ. Epidemiology and natural history of HCV infection. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2013;10(9):553-562.
- Halfon P, Cacoub P. Prise en charge thérapeutique de l'hépatite C à l'heure des agents antiviraux directs : vers une éradication virale. *Rev Médecine Interne.* 2014;35(4):219-221.
- Halfon P, Locarnini S. Hepatitis C virus resistance to protease inhibitors. *J Hepatol.* 2011;55(1):192-206.
- Hayashi H, Beppu T, Shirabe K, Maehara Y, Baba H. Management of thrombocytopenia due to liver cirrhosis: A review. *World J Gastroenterol.* 2014;20(10):2595-2605.
- Hézode C, Fontaine H, Dorival C, Larrey D, Zoulim F, Canva V, et al. Triple therapy in treatment-experienced patients with HCV-cirrhosis in a multicentre cohort of the French Early Access Programme (ANRS CO20-CUPIC) - NCT01514890. *J Hepatol.* 2013;59(3):434-441.
- Hézode C, Fontaine H, Dorival C, Zoulim F, Larrey D, Canva V, et al. Effectiveness of Telaprevir or Boceprevir in Treatment-experienced Patients with HCV Genotype 1 Infection and Cirrhosis. *Gastroenterology.* 2014. *Sous presse.*
- Hing JP, Woolfrey SG, Greenslade D, Wright PM. Analysis of toxicokinetic data using NONMEM: impact of quantification limit and replacement strategies for censored data. *J Pharmacokinet Pharmacodyn.* 2001;28(5):465-479.
- Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature.* 12 janv 1995;373(6510):123-126.
- Homma M, Jayewardene AL, Gambertoglio J, Aweeka F. High-performance liquid chromatographic determination of ribavirin in whole blood to assess disposition in erythrocytes. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(11):2716-2719.
- Hughes JP. Mixed effects models with censored data with application to HIV RNA levels. *Biometrics.* 1999;55(2):625-629.

- Inoue Y, Homma M, Matsuzaki Y, Shibata M, Matsumura T, Ito T, et al. Erythrocyte ribavirin concentration for assessing hemoglobin reduction in interferon and ribavirin combination therapy. *Hepatol Res.* 2006;34(1):23-27.
- InVS. Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire n°20-21. Numéro thématique - Surveillance et prévention des hépatites B et C en France : bilan et perspectives. 2009.
- Jacobson IM, Gordon SC, Kowdley KV, Yoshida EM, Rodriguez-Torres M, Sulkowski MS, et al. Sofosbuvir for hepatitis C genotype 2 or 3 in patients without treatment options. *N Engl J Med.* 2013;368(20):1867-1877.
- Jacobson IM, McHutchison JG, Dusheiko G, Di Bisceglie AM, Reddy KR, Bzowej NH, et al. Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med.* 2011;364(25):2405-2416.
- Jacqmin-Gadda H, Thiébaud R, Chêne G, Commenges D. Analysis of left-censored longitudinal data with application to viral load in HIV infection. *Biostatistics.* 2000;1(4):355-368.
- Jensen DM, Marcellin P, Freilich B, Andreone P, Di Bisceglie A, Brandão-Mello CE, et al. Re-treatment of patients with chronic hepatitis C who do not respond to peginterferon-alpha2b: a randomized trial. *Ann Intern Med.* 2009;150(8):528-540.
- Johansson AM, Ueckert S, Plan EL, Hooker AC, Karlsson MO. Evaluation of bias, precision, robustness and runtime for estimation methods in NONMEM 7. *J Pharmacokinet Pharmacodyn.* 2014. *Sous presse.*
- Jusko WJ, Ko HC. Physiologic indirect response models characterize diverse types of pharmacodynamic effects. *Clin Pharmacol Ther.* 1994;56(4):406-419.
- Kamal SM, Nasser IA. Hepatitis C genotype 4: What we know and what we don't yet know. *Hepatol.* 2008;47(4):1371-1383.
- De Kanter CTMM, Drenth JPH, Arends JE, Reesink HW, van der Valk M, de Kneegt RJ, et al. Viral hepatitis C therapy: pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. *Clin Pharmacokinet.* 2014;53(5):409-427.
- Keating GM, Curran MP. Peginterferon-alpha-2a (40kD) plus ribavirin: a review of its use in the management of chronic hepatitis C. *Drugs.* 2003;63(7):701-730.
- Khuroo MS, Khuroo MS, Dahab ST. Meta-analysis: a randomized trial of peginterferon plus ribavirin for the initial treatment of chronic hepatitis C genotype 4. *Aliment Pharmacol Ther.* 2004;20(9):931-938.
- Komarova NL, Wodarz D. Evolutionary dynamics of mutator phenotypes in cancer: implications for chemotherapy. *Cancer Res.* 2003;63(20):6635-6642.

- Krishnan SM, Dixit NM. A formula to estimate the optimal dosage of ribavirin for the treatment of chronic hepatitis C: influence of ITPA polymorphisms. *Antivir Ther.* 2012;17(8):1581-1592.
- Kuhn E, Lavielle M. Maximum likelihood estimation in nonlinear mixed effects models. *Comput Stat Data Anal.* 2005;49:1020-1038.
- Laouénan C, Guedj J, Mentré F. Clinical trial simulation to evaluate power to compare the antiviral effectiveness of two hepatitis C protease inhibitors using nonlinear mixed effect models: a viral kinetic approach. *BMC Med Res Methodol.* 2013;13:60.
- Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med.* 2001;345(1):41-52.
- Lavanchy D. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(2):107-115.
- Lawitz E, Mangia A, Wyles D, Rodriguez-Torres M, Hassanein T, Gordon SC, et al. Sofosbuvir for previously untreated chronic hepatitis C infection. *N Engl J Med.* 2013;368(20):1878-1887.
- Lewin SR, Ribeiro RM, Walters T, Lau GK, Bowden S, Locarnini S, et al. Analysis of hepatitis B viral load decline under potent therapy: complex decay profiles observed. *Hepatology.* 2001;34(5):1012-1020.
- Lindstrom ML, Bates DM. Nonlinear mixed effects models for repeated measures data. *Biometrics.* 1990;46(3):673-687.
- Loustaud-Ratti V, Alain S, Rousseau A, Hubert IF, Sauvage FL, Marquet P, et al. Ribavirin exposure after the first dose is predictive of sustained virological response in chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2008;47(5):1453-1461.
- Lynn HS. Maximum likelihood inference for left-censored HIV RNA data. *Stat Med.* 2001;20(1):33-45.
- Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet.* 2001;358(9286):958-965.
- Manns MP, Wedemeyer H, Cornberg M. Treating viral hepatitis C: efficacy, side effects, and complications. *Gut.* 2006;55(9):1350-1359.
- Marcellin P. Hepatitis B and hepatitis C in 2009. *Liver Int.* 2009;29 Suppl 1:1-8.
- Marinho RT, Vitor S, Velosa J. Benefits of curing hepatitis C infection. *J Gastrointest Liver Dis.* 2014;23(1):85-90.

- Merck. Boceprevir clinical pharmacology and biopharmaceutics review(s). 2011. http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2011/202258orig1s000clinpharmr.pdf. Consulté le 18 Janvier 2014.
- Mihm U, Herrmann E, Sarrazin C, Zeuzem S. Review article: predicting response in hepatitis C virus therapy. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006;23(8):1043-1054.
- Mihm U, Welker M-W, Teuber G, Wedemeyer H, Berg T, Sarrazin C, et al. Impact of ribavirin priming on viral kinetics and treatment response in chronic hepatitis C genotype 1 infection. *J Viral Hepat*. 2014;21(1):42-52.
- Neumann AU, Lam NP, Dahari H, Davidian M, Wiley TE, Mika BP, et al. Differences in viral dynamics between genotypes 1 and 2 of hepatitis C virus. *J Infect Dis*. 2000;182(1):28-35.
- Neumann AU, Lam NP, Dahari H, Gretch DR, Wiley TE, Layden TJ, et al. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science*. 1998;282(5386):103-107.
- Osinusi A, Meissner EG, Lee Y-J, Bon D, Heytens L, Nelson A, et al. Sofosbuvir and ribavirin for hepatitis C genotype 1 in patients with unfavorable treatment characteristics: a randomized clinical trial. *JAMA*. 2013;310(8):804-811.
- Panhard X, Goujard C, Legrand M, Taburet AM, Diquet B, Mentre F. Population pharmacokinetic analysis for nelfinavir and its metabolite M8 in virologically controlled HIV-infected patients on HAART. *Br J Clin Pharmacol*. 2005;60(4):390-403.
- Panhard X, Samson A. Extension of the SAEM algorithm for nonlinear mixed models with 2 levels of random effects. *Biostatistics*. 2009;10(1):121-135.
- Pawlotsky J-M. Résistance du virus de l'hépatite C aux traitements antiviraux. *Virologie*. 2000;4(5):353-359.
- Pawlotsky J-M, Dahari H, Neumann AU, Hezode C, Germanidis G, Lonjon I, et al. Antiviral action of ribavirin in chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2004;126(3):703-714.
- Pawlotsky J-M, Dhumeaux D. Hépatite C. Paris : Edition EDK, 2004.
- Pedder SCJ. Pegylation of interferon alfa: structural and pharmacokinetic properties. *Semin Liver Dis*. 2003;23 Suppl 1:19-22.
- Perelson AS. Modelling viral and immune system dynamics. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(1):28-36.
- Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science*. 1996;271(5255):1582-1586.

- Perelson AS, Ribeiro RM. Estimating drug efficacy and viral dynamic parameters: HIV and HCV. *Stat Med*. 2008;27(23):4647-4657.
- Perry CM, Jarvis B. Peginterferon-alpha-2a (40 kD): a review of its use in the management of chronic hepatitis C. *Drugs*. 2001;61(15):2263-2288.
- Pinheiro J, Bates DM. *Mixed Effects Models in S and S-Plus*. New York : Springer Verlag, 2000.
- Pol S, Ghalib RH, Rustgi VK, Martorell C, Everson GT, Tatum HA, et al. Daclatasvir for previously untreated chronic hepatitis C genotype-1 infection: a randomised, parallel-group, double-blind, placebo-controlled, dose-finding, phase 2a trial. *Lancet Infect Dis*. 2012;12(9):671-677.
- Poordad F, Lawitz E, Reddy KR, Afdhal NH, Hézode C, Zeuzem S, et al. Effects of ribavirin dose reduction vs erythropoietin for boceprevir-related anemia in patients with chronic hepatitis C virus genotype 1 infection, a randomized trial. *Gastroenterology*. 2013;145(5):1035-1044.
- Poordad F, McCone J Jr, Bacon BR, Bruno S, Manns MP, Sulkowski MS, et al. Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med*. 2011;364(13):1195-1206.
- Powathil GG, Swat M, Chaplain MAJ. Systems oncology: Towards patient-specific treatment regimes informed by multiscale mathematical modelling. *Semin Cancer Biol*. 2014. DOI: 10.1016/j.semcancer.2014.02.003.
- Poynard T, Colombo M, Bruix J, Schiff E, Terg R, Flamm S, et al. Peginterferon alfa-2b and ribavirin: effective in patients with hepatitis C who failed interferon alfa/ribavirin therapy. *Gastroenterology*. 2009;136(5):1618-1628.
- Preston SL, Drusano GL, Glue P, Nash J, Gupta SK, McNamara P. Pharmacokinetics and absolute bioavailability of ribavirin in healthy volunteers as determined by stable-isotope methodology. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43(10):2451-2456.
- Reesink HW, Zeuzem S, Weegink CJ, Forestier N, van Vliet A, van de Wetering de Rooij J, et al. Rapid decline of viral RNA in hepatitis C patients treated with VX-950: a phase Ib, placebo-controlled, randomized study. *Gastroenterology*. 2006;131(4):997-1002.
- Retout S, Comets E, Samson A, Mentré F. Design in nonlinear mixed effects models: optimization using the Fedorov-Wynn algorithm and power of the Wald test for binary covariates. *Stat Med*. 2007;26(28):5162-5179.
- Ribba B, Kaloshi G, Peyre M, Ricard D, Calvez V, Tod M, et al. A tumor growth inhibition model for low-grade glioma treated with chemotherapy or radiotherapy. *Clin Cancer Res*. 2012;18(18):5071-5080.

- Ribeiro RM, Lo A, Perelson AS. Dynamics of hepatitis B virus infection. *Microbes Infect.* 2002;4(8):829-835.
- Robertson B, Myers G, Howard C, Brettin T, Bukh J, Gaschen B, et al. Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. *International Committee on Virus Taxonomy. Arch Virol.* 1998;143(12):2493-2503.
- Rong L, Dahari H, Ribeiro RM, Perelson AS. Rapid emergence of protease inhibitor resistance in hepatitis C virus. *Sci Transl Med.* 2010;2(30):30ra32.
- Rotman Y, Nouredin M, Feld JJ, Guedj J, Witthaus M, Han H, et al. Effect of ribavirin on viral kinetics and liver gene expression in chronic hepatitis C. *Gut.* 2014;63(1):161-169.
- Samson A, Lavielle M, Mentré F. Extension of the SAEM algorithm to left censored data in nonlinear mixed-effects model: Application to HIV dynamics model. *Comput Stat Data Anal.* 2006;51:1562-1574.
- Sheiner L, Beal S. NONMEM Version 51. University of California, NONMEM Project Group, San Francisco, 1998.
- Sheiner LB, Rosenberg B, Marathe VV. Estimation of population characteristics of pharmacokinetic parameters from routine clinical data. *J Pharmacokinet Biopharm.* 1977;5(5):445-479.
- Sheiner LB, Rosenberg B, Melmon KL. Modelling of individual pharmacokinetics for computer-aided drug dosage. *Comput Biomed Res Int J.* 1972;5(5):411-459.
- Snoeck E, Chanu P, Lavielle M, Jacqmin P, Jonsson EN, Jorga K, et al. A comprehensive hepatitis C viral kinetic model explaining cure. *Clin Pharmacol Ther.* 2010;87(6):706-713.
- Solas C, Paré M, Quaranta S, Stanke-Labesque F, Groupe Suivi Therapeutique Pharmacologique de la Societe Francaise de Pharmacologie et de Therapeutique. [Evidence-based therapeutic drug monitoring for ribavirine]. *Thérapie.* 2011;66(3):221-230.
- Sulkowski MS, Wasserman R, Brooks L, Ball L, Gish R. Changes in haemoglobin during interferon alpha-2b plus ribavirin combination therapy for chronic hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat.* 2004;11(3):243-250.
- Tanaka H, Miyano M, Ueda H, Fukui K, Ichinose M. Changes in serum and red blood cell membrane lipids in patients treated with interferon ribavirin for chronic hepatitis C. *Clin Exp Med.* 2005;5(4):190-195.

- Thiébaud R, Guedj J, Jacqmin-Gadda H, Chêne G, Trimoulet P, Neau D, et al. Estimation of dynamical model parameters taking into account undetectable marker values. *BMC Med Res Methodol*. 2006;6:38.
- Toyoda H, Kumada T. Pharmacotherapy of chronic hepatitis C virus infection - the IDEAL trial: « 2b or not 2b (= 2a), that is the question ». *Expert Opin Pharmacother*. 2009;10(17):2845-2857.
- Vertex Pharmaceuticals. Telaprevir clinical pharmacology and biopharmaceutics review(s). 2010. Accessible à : http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2011/201917Orig1s000ClinPharmR.pdf. Consulté le 18 Janvier 2014.
- Vonesh EF. A note on the use of Laplace's approximation for nonlinear mixed-effects models. *Biometrika*. 1996;83(2):447-452.
- Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, Johnson VA, Emini EA, Deutsch P, et al. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature*. 1995;373(6510):117-122.
- Wolfinger R. Laplace's Approximation for Nonlinear Mixed Models. *Biometrika*. 1993;80(4):791-795.
- World Health Organization, WHO Fact Sheet 164-Hepatitis C. Accessible à : <http://www.who.int.gate2.inist.fr/mediacentre/factsheets/fs164/en/>. Consulté le 31 Janvier 2014.
- Yang S, Roger J. Evaluations of Bayesian and maximum likelihood methods in PK models with below-quantification-limit data. *Pharm Stat*. 2010;9(4):313-330.
- Zeuzem S, Andreone P, Pol S, Lawitz E, Diago M, Roberts S, et al. Telaprevir for retreatment of HCV infection. *N Engl J Med*. 2011;364(25):2417-2428.
- Zeuzem S, Hultcrantz R, Bourliere M, Goeser T, Marcellin P, Sanchez-Tapias J, et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin for treatment of chronic hepatitis C in previously untreated patients infected with HCV genotypes 2 or 3. *J Hepatol*. 2004;40(6):993-999.
- Zoulim F, Haem J, Ahmed SS, Chossegros P, Habersetzer F, Chevallier M, et al. Ribavirin monotherapy in patients with chronic hepatitis C: a retrospective study of 95 patients. *J Viral Hepat*. 1998;5(3):193-198.

Résumé

L'introduction depuis 2011 des trithérapies associant un inhibiteur de protéase (IP), telaprevir ou boceprevir, à l'interféron pégylé et la ribavirine (Peg-IFN/RBV), constitue un tournant majeur dans la lutte contre le virus de l'hépatite C (VHC). Cependant la réponse au traitement chez les patients cirrhotiques reste mal connue et pose de sérieux problèmes de tolérance. Les modèles de cinétique virale, analysés par modèles non-linéaires à effets mixtes (MNLEM), constituent un outil puissant pour la compréhension de la réponse au traitement.

Nous avons démontré par simulation la puissance du test de Wald dans le cadre des MNLEM pour détecter une différence d'efficacité antivirale entre deux traitements. Cette approche, même pour un nombre réduit de prélèvements, s'est révélée systématiquement supérieure à l'approche standard reposant sur un test de Wilcoxon sur le déclin de charge virale. Cependant nous avons mis en évidence une inflation de l'erreur de type I de ce test lorsque le nombre de patients est faible et avons proposé une correction par permutation.

Nous avons appliqué cette approche pour estimer l'efficacité antivirale des trithérapies chez des patients cirrhotiques en échec thérapeutique (ANRS MODCUPIC). Nous avons démontré que plus de 99% de la réplication virale était bloqué par les IP, avec une efficacité significativement supérieure du telaprevir par rapport au boceprevir, et une efficacité sous-optimale de Peg-IFN/RBV.

Enfin, en modélisant la cinétique des paramètres sanguins, nous avons démontré que les concentrations de Peg-IFN et de RBV sont directement associées, respectivement, à l'anémie et la thrombopénie fréquemment observées chez ces patients.

Abstract

Since 2011, the introduction of triple therapies combining a protease inhibitor (PI), telaprevir or boceprevir, with the pegylated-interferon and the ribavirin (Peg-IFN/RBV) marked a milestone for anti hepatitis C virus (HCV) therapy. However, the response to treatment in cirrhotic patients remains unclear and poses serious safety problems. Viral kinetic models, analyzed by nonlinear mixed effect models (NLMEM), are a powerful tool for understanding the response to treatment.

We have demonstrated, by means of clinical trial simulation, the power of the Wald test within NLMEM to detect a HCV drug's antiviral effectiveness difference. This approach, even for a small number of samples, provided consistently higher power to the standard approach based on a non parametric Wilcoxon test on the viral load decay. However, we have highlighted an inflation of the type I error with the Wald test when the number of patients is low and have proposed a permutation correction.

We applied this approach to estimate the antiviral effectiveness of the triple therapies in cirrhotic patients and non-responders to a prior therapy (ANRS MODCUPIC). We have shown that over 99% of the viral replication was blocked by PI, with a significantly superior effectiveness of telaprevir compared to boceprevir and suboptimal effectiveness of Peg-IFN/RBV.

Finally, by modeling the kinetics of blood parameters, we demonstrated that the concentrations of Peg-IFN and RBV are associated with, respectively, anemia and thrombocytopenia which are frequently observed in these patients.

Mots-clés

Modèles non linéaires à effets mixtes ; Tests ; Virus de l'hépatite C ; Interféron pégylé ; Ribavirine ; Inhibiteur de la protéase ; Cinétique virale ; Pharmacocinétique.